

定量的標的プロテオミクスに基づく悪性腫瘍に対する抗癌剤感受性変動因子の解明

著者	小湊 航
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	11301甲第15773号
URL	http://hdl.handle.net/10097/58761

定量的標的プロテオミクスに基づく
悪性腫瘍に対する抗癌剤感受性変動因子の解明

東北大学大学院薬学研究科
医療薬科学専攻
小渕 航

略語表

2D-PAGE	2-dimensional poly-acrylamide gel electrophoresis
4F2hc	4F2 heavy chain antigen
5-ALA	5-aminolevulinic acid
ABC	ATP-binding cassette
ACNU	Nimustine
ARTN	Artemin
ASCT	Alanine-serine-cysteine transporter
ATA1	Amino acid transporter A1
ATP	Adenosine triphosphate
BCRP	Breast cancer resistance protein
CBB	Coomassie brilliant blue
CBDCA	Carboplatin
CD	Cluster of differentiation
CDDP	Cisplatin
CE	Collision energy
CID	Collision-induced dissociation
C/M	Cell to medium
CPT	Camptothecin
CTx	Chemotherapy
DHFR	Dihydrofolate reductase
DNA	Deoxyribonucleic acid
DP	Declustering potential
EGFR	Epidermal growth factor receptor
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ENT	Equilibrative nucleoside transporter
ERBB2	Human epidermal growth factor receptor-2 (HER2)
ERK	Mitogen-activated protein kinase (MAPK)
FAK	Focal adhesion kinase
FBS	Fetal bovine serum
FGFR	Fibroblast growth factor receptor
FPGS	Folypolyglutamate synthase
GBM	Glioblastoma multiforme
GDNF	Glial cell line-derived neurotrophic factor
GEM	Gemcitabine
GGH	Gamma-glutamyl hydrolase
GI ₅₀	50% growth inhibition concentration
GLUT	Glucose transporter
GRB	Growth factor receptor-bound protein
HAMMOC	Hydroxy acid-modified metal oxide chromatography

HSP	Heat shock protein
IC ₅₀	50% inhibitory concentration
IGFR	Insulin-like growth factor receptor
JAM	Junctional adhesion molecule
KRAS	GTPase Kras
LAT	L-type amino acid transporter
LC	Liquid chromatography
Lys-C	Lysyl endopeptidase
MBT	Metastatic brain tumor
MCNU	Ranimustine
MCT	Monocarboxylate transporter
MDR1	Multidrug resistance protein 1
MEK	MAPK/ERK kinase
MET	Hepatocyte growth factor receptor (HGF)
MGMT	O-6-methylguanine-DNA-alkyltransferase
MRI	Magnetic resonance imaging
MRM	Multiple reaction monitoring
MRP	Multidrug resistance-associated protein
MS	Mass spectrometry
mTOR	Mammalian target of rapamycin
MTX	Methotrexate
MTX-Glu _n	Methotrexate polyglutamate
NF	Neurofibromin
NRTN	Neurturin
OATP	Organic anion transporter polypeptide
PCFT	Proton-coupled folate transporter
PCR	Polymerase chain reaction
PDGFR	Platelet-derived growth factor receptor
PECAM	Platelet endothelial cell adhesion molecule
PEPT	Peptide transporter
PET	Positron emission tomography
PFS	Progression-free survival
P-gp	P-glycoprotein
PSPN	Persephin
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
QOL	Quality of life
RAF	Proto-oncogene c-RAF
RAPTOR	Regulatory-associated protein of mTOR
Rec	Recurrent tumor
RET	Proto-oncogene c-Ret
RFC	Reduced folate carrier
RLIP76	76 kDa Ral-interacting protein
RNA	Ribonucleic acid

RTx	Radiation therapy
SCF	Stem cell factor
SDS-PAGE	Sodium lauryl sulfate poly-acrylamide gel electrophoresis
SLC	Solute carrier
SRM	Selected reaction monitoring
STAT	Signal transducer and activator of transcription
TKI	Tyrosine kinase inhibitor
TMZ	Temozolomide
VCR	Vincristine
VEGFR	Vascular endothelial growth factor receptor
WHO	World Health Organization
γ -gtp	Gamma-glutamyl transpeptidase

目次

第1章 諸言

第1節	悪性腫瘍における化学療法の現状と個別化治療の必要性	...1
第2節	抗癌剤感受性の変動に関与し得る因子	...5
第3節	抗癌剤感受性の変動に関与する因子の解明に向けた戦略	...10
第4節	本研究の目的	...16

第2章 癌細胞パネルを用いた薬剤感受性変動に関与する因子の同定

第1節	序論	...17
第2節	結果	
2-2-1.	胃癌および乳癌細胞株におけるトランスポータータンパク質発現量	...19
2-2-2.	胃癌細胞株における MRP1 発現量と抗癌剤感受性の比較解析	...23
2-2-3.	胃癌細胞株における etoposide 感受性に対する MRP1 発現の影響	...26
2-2-4.	乳癌細胞株におけるトランスポータータンパク質発現量と抗癌剤感受性の比較解析	...28
2-2-5.	乳癌細胞株における methotrexate 感受性に対する RFC1 発現の影響	...30
2-2-6.	乳癌細胞株における methotrexate 代謝関連酵素発現量	...33
2-2-7.	乳癌細胞株における methotrexate ポリグルタミル化体の細胞内蓄積量	...36
第3節	考察	...37

第3章 悪性脳腫瘍組織検体における膜タンパク質発現プロファイルの解明

第1節	序論	...43
第2節	結果	
3-2-1.	悪性脳腫瘍組織からの細胞膜画分調製	...45
3-2-2.	悪性脳腫瘍組織における複数膜タンパク質絶対発現量	...48
3-2-3.	悪性脳腫瘍組織の種類間における膜タンパク質発現量比較	...63
3-2-4.	同一患者の初発時および再発時における膜タンパク質発現量比較	...68
3-2-5.	同一患者の腫瘍部位および非腫瘍部位における膜タンパク質発現量比較	...71
3-2-6.	GBM 検体における膜タンパク質発現量と予後指標との比較	...73
3-2-7.	同一患者の MRI 造影および非造影領域における膜タンパク質発現量	...74
第3節	考察	...75

第4章 悪性脳腫瘍 xenograft における分子標的薬感受性に対する膜タンパク質 発現量の影響	
第1節 序論	...87
第2節 結果	
4-2-1. 悪性脳腫瘍 xenograft における膜タンパク質発現	...91
4-2-2. 悪性脳腫瘍 xenograft における EGFR 変異体発現	...93
4-2-3. 悪性脳腫瘍 xenograft における膜タンパク質発現と抗癌剤感受性比較	...96
第3節 考察	...98
第5章 LC-MS/MS を用いたリン酸化 EGFR 定量法の確立および発現解析	
第1節 序論	...104
第2節 結果	
5-2-1. LC-MS/MS を用いた EGFR 自己リン酸化体定量法の確立	...105
5-2-2. EGF 処理培養細胞株を用いた EGFR 自己リン酸化体検出確認	...113
5-2-3. 悪性脳腫瘍 xenograft における EGFR 自己リン酸化体発現解析	...117
第3節 考察	...122
第6章 安定同位元素標識タンパク質を用いた分子標的薬感受性関連分子一斉 定量法の確立および発現解析	
第1節 序論	...125
第2節 結果	
6-2-1. 分子標的薬感受性関連分子一斉定量用タンパク質の合成	...127
6-2-2. 分子標的薬感受性関連分子一斉定量の測定条件最適化	...135
6-2-3. 悪性脳腫瘍 xenograft における分子標的薬感受性関連分子一斉定量	...138
第3節 考察	...144
第7章 結論および展望	...148
第8章 試薬および実験方法	...151
引用文献	...163
発表論文リスト	...174
謝辞	...176

第1章 緒言

第1節 悪性腫瘍における化学療法の現状と個別化治療の必要性

悪性腫瘍治療法の現状

悪性腫瘍は日本において死亡者総数の 28%を占め死因順位の第一位である疾患となっている(厚生労働省平成 24 年人口動態統計)。悪性腫瘍に対する治療法としては主に①外科的手術による悪性腫瘍部位の切除、②放射線治療、および③化学療法が挙げられる。悪性腫瘍が比較的早期で発見され、転移が認められずに局所にとどまっている場合、多くの症例においてまずは外科的手術や放射線治療等の治療が行われている。特に、外科的手術による腫瘍の摘出率が高いほど予後が良好となることが報告されており、腫瘍の摘出率が腫瘍の再発および予後に関連する重要な因子である(Lacroix *et al.*, 2001)。近年の外科的手術や放射線治療の技術的進歩は悪性腫瘍患者の予後改善に大きく貢献している。しかし、悪性腫瘍が進行しており遠隔転移または周囲の組織への浸潤が認められる場合は外科的手術や放射線治療に加え化学療法が非常に重要となっている。

悪性腫瘍に対する化学療法の歴史

悪性腫瘍に対する化学療法の歴史は第一次世界大戦で使用されたマスタードガスまで遡る。Alfred Gilman と Louis Goodman は 1943 年にマスタードガスの硫黄原子を窒素原子に置換した化合物であるナイトロジェンマスタードが非ホジキンリンパ腫患者に対して効果を示すことを突き止めた。ナイトロジェンマスタードはDNAをアルキル化することによって核酸の合成を妨げて抗悪性腫瘍効果を示し、外科的手術および放射線療法しか悪性腫瘍に対する治療法が無かった時代に世界初の抗癌剤として登場した(DeVita and Chu, 2008)。この結果はアル

キル化剤開発のきっかけとなり、後に cyclophosphamide が開発され現在でも悪性リンパ腫、乳癌、肺癌等の化学療法に使用されている。ナイトロジェンマスタードが世界発の抗癌剤として登場した後、1950 年代には葉酸代謝拮抗剤である methotrexate が、1960 年代にはフッ化ピリミジン系代謝拮抗剤である 5-fluorouracil や微小管阻害薬である vincristine が、1970 年代には白金製剤である cisplatin や抗腫瘍性抗生物質である doxorubicin が、1980 年代にはトポイソメラーゼ II 阻害剤である etoposide などが承認され、多くの抗癌剤が悪性腫瘍の化学療法に使用されるようになった。

前述したこれらの抗癌剤は全て細胞分裂の過程に直接作用するタイプの抗癌剤であり、腫瘍細胞への特異性が低く、正常細胞に対する傷害性が強いため、重篤な副作用発現が多いことが問題点であった。1990 年代には分子標的薬である rituximab が承認され、この分子標的薬の登場により悪性腫瘍の治療方針が大きく変化した。特に 2000 年以降では承認される抗癌剤の多数が分子標的薬となり、悪性腫瘍に対する化学療法における分子標的薬の占める割合が増加してきている。分子標的薬は創薬戦略として薬剤の開発段階から標的分子を決めて開発しており、腫瘍細胞への特異性が高く、高い抗腫瘍効果が期待されている。一方で、分子標的薬でも副作用は認められるものの、重篤な副作用発現は従来の抗悪性腫瘍薬と比較して少ないとされている。しかし、分子標的薬の効果はその標的が存在するか存在しないかによって決まり、腫瘍細胞特異的分子標的治療の場合、その効果は“all or nothing”であると考えられており、標的分子を発現していない細胞には全く効果が認められない。従って、抗腫瘍スペクトラムは狭く、その反面、一部の患者に対しては劇的な効果を示すという特徴を有している(Saijo *et al.*, 2009)。

悪性腫瘍に対する化学療法の現状と個別化治療の必要性

悪性腫瘍患者の臨床症状や予後、そして腫瘍の性格はそれぞれの患者で異なり、化学療法に対する効果も同様に患者間で大きく異なる。1990年代後半に分子標的薬が登場するまでは、悪性腫瘍に対する化学療法は各腫瘍の種類によって使用する薬剤は異なるものの、同じ悪性腫瘍の患者には同様の化学療法が行われてきた。実際の臨床の間では、多くの悪性腫瘍は化学療法の初期の段階で良い腫瘍縮小効果を示す。しかし、これらの腫瘍は次第に薬剤耐性を引き起こし抗癌剤の効果が減弱し、このことが現在の化学療法の障壁となっている(Liu, 2009)。その結果、最初は抗癌剤が効果を示していた悪性腫瘍の患者の多くで腫瘍の悪化・進行が認められる。このように、初期の段階では化学療法が有効であるが、後に化学療法の効果が認められなくなるという現象は”獲得耐性”と呼ばれており、多くの薬剤耐性がこれに当てはまる(Lu and Shervington, 2008)。一方で、黒色腫や肝臓癌など、化学療法を行う以前から抗癌剤に対する薬剤耐性を有している悪性腫瘍も存在し、これは”自然耐性”と呼ばれている(Schadendorf *et al.*, 1994)。さらに、副作用によるQOLの低下、効果の認められない治療を続けることによる経済的な負担もまた問題となっている。

前述した通り、分子標的薬はこれまでの抗癌剤とは異なり標的分子が発現している患者に対しては大きな治療効果が得られている。近年の悪性腫瘍に対する化学療法における分子標的薬使用へのシフトは、化学療法の個別化の重要性を示しており、今後もこの流れが続くと考えられる。しかし、乳癌や大腸癌、非小細胞肺癌など標準治療に分子標的薬を含んでいる悪性腫瘍が増加してきた一方、分子標的治療が標準治療となっていない悪性腫瘍も多い。さらに、分子標的薬に対する薬剤耐性も近年報告されるなど新たな問題点も挙がってきた(Sartore-Bianchi *et al.*, 2010)。現在分子標的療法を行う際、多くは1種類の分子の発現のみを解析するため、その標的分子の発現が認められないと分子標的薬の

適応とはならない。従って、現段階では分子標的治療の適応は狭く、分子標的薬の適応範囲を増加させることが非常に重要となってくる。また、分子標的薬や従来の抗癌剤も含めた薬剤感受性の予測を行うことも治療効果を最大限引き出すために必要となる。

これらの問題点を解決して現在の個別化治療をさらに細分化し、本当の意味での個別化治療・テーラーメイド治療につなげていくことが悪性腫瘍の治療に求められている。そのためには、分子標的薬含む抗癌剤感受性変動の要因を明らかにし、その結果を迅速に臨床へと応用する基盤を構築することが必要となってくる。

第2節 抗癌剤感受性の変動に関与し得る因子

第1節で述べた通り、悪性腫瘍に対する個別化治療を行うにあたり、分子標的薬を含む抗癌剤感受性の変動に関与する因子を同定することが必須である。抗癌剤が腫瘍細胞に対して薬効を発揮するためには、(i) 腫瘍細胞内へと抗癌剤が取り込まれ、(ii) 各抗癌剤の標的分子へと作用すること、が最低限必要である。細胞内への抗癌剤の取り込みにはトランスポータータンパク質が、抗癌剤(特に分子標的薬)の標的分子として増殖因子受容体等が挙げられる。そこで、本節ではトランスポータータンパク質および増殖因子受容体等に関して概説する。

抗癌剤の細胞内濃度に関与するトランスポータータンパク質

現在、悪性腫瘍に対する化学療法における薬剤耐性には、薬剤の細胞内への取り込みや細胞外への排出を担うトランスポータータンパク質の発現量変動が原因となることが知られている。トランスポータータンパク質には主に ATP-binding cassette (ABC)トランスポーターと solute carrier (SLC)トランスポーターが存在する。

ABC トランスポーターは ATP の加水分解エネルギーを利用する 1 次性能動輸送担体であり、各種代謝物、イオン、脂質、ペプチド、タンパク質および薬剤などの輸送に関与し、例えば、MDR1、MRP family および BCRP による広い基質認識に基づく薬剤の細胞外への排出が薬剤耐性に関与していることが考えられている(Szakacs *et al.*, 2006)。MDR1 は vincristine や doxorubicin、etoposide、paclitaxel などの抗癌剤を基質とし、細胞外へと排出することが報告されている。MRP family はグルクロン酸抱合体やグルタチオン抱合体などのアニオン性化合物を輸送する。MRP1 はさらに methotrexate や doxorubicin、etoposide などを輸送することが報告されている(Loscher and Potschka, 2005)。MRP4 はヌクレオシド誘導体の薬物を基質とし、抗癌剤である 6-mercaptopurine や 6-thioguanine の輸送に

関与することが報告されており、MRP4 を transfection した NIH3T3 細胞において 6-mercaptopurine に対する耐性度が 4.6 倍上昇している(Chen *et al.*, 2001)。また、MRP4 は methotrexate を基質とすることも報告されている(van Aubel *et al.*, 2002, Uchida *et al.*, 2007)。BCRP は methotrexate や topotecan、SN-38 (irinotecan のプロドラッグ)などの抗癌剤を基質とすることが報告されている(Maliepaard *et al.*, 1999, Volk and Schneider, 2003)。ヒト小細胞肺癌細胞株では PC-6 が SN-38 に対して 34 倍耐性化した細胞株において BCRP の高発現が mRNA レベルで認められている(Kawabata *et al.*, 2001)。

SLC トランスポーターは多様な機能を持ち、薬物の体内動態に密接に関与している。また、栄養分の吸収や臓器分布、代謝物の排泄などにも関与し、生理的にも重要な役割を担っている。また、抗癌剤に対する薬剤耐性には葉酸や核酸、アミノ酸トランスポーターの輸送を担う SLC トランスポーターの発現量が関係しているとされている(Huang and Sadee, 2006)。葉酸取り込みトランスポーターである RFC1 は、葉酸類似体である methotrexate を基質として細胞内へと取り込むことが報告されており、急性リンパ性白血病細胞株である MOLT-3 を 7800 倍 methotrexate に対して耐性化した細胞において RFC1 の発現量が 50%減少している(Moscow *et al.*, 1997, Kobayashi *et al.*, 1998)。また、核酸取り込みトランスポーターである ENT1 は gemcitabine や cytarabine などの抗癌剤を基質とすることが報告されており、ENT1 のタンパク質発現量と gemcitabine 感受性に相関性が認められている(Huang and Sadee, 2006, Marce *et al.*, 2006)。アミノ酸取り込みトランスポーターである LAT1 は melphalan を基質とすることが報告されており、melphalan に対する耐性は LAT1 の発現量低下によるものであると考えられている(Ganapathy *et al.*, 2009)。

これまで述べたように、薬剤耐性に関与し得るトランスポータータンパク質などの耐性候補因子は複数存在する。従って、1 つのトランスポータータンパク

質のみに着目するのではなく、複数のトランスポータータンパク質に着目することが抗癌剤感受性変動に関与するトランスポータータンパク質を同定するために必須であると考えられる。

分子標的薬の標的分子である増殖因子受容体等

抗癌剤が薬効を発揮するためには最終的に標的分子へと作用することが必要であり、特に分子標的薬においては標的分子の発現が薬効を発揮する上で非常に重要となっている。分子標的薬の標的分子は、増殖因子受容体、血管新生に関与する受容体、細胞表面抗原などに分類される。

悪性腫瘍では、増殖因子受容体の遺伝子増幅やタンパク質の過剰発現が報告されている。これまでに脳腫瘍組織では epidermal growth factor receptor (EGFR)、platelet-derived growth factor receptor- α (PDGFR α)および human epidermal growth factor receptor-2 (ERBB2/HER2)などの増殖因子受容体の遺伝子増幅や免疫染色によるタンパク質レベルでの発現が示されている(Kristt and Yarden, 1996, Varela *et al.*, 2004)。EGFR、PDGFR α および ERBB2 はいずれもチロシンキナーゼ型受容体であり、リガンドの刺激を受けると受容体はリン酸化を受け細胞内シグナル伝達経路が活性化し、核内にシグナルが伝達される。その結果、細胞増殖、アポトーシス抑制、血管新生、浸潤、転移などが引き起こされる(Scaltriti and Baselga, 2006, Andrae *et al.*, 2008)。

EGFR は ERBB family に属し、細胞外ドメイン、細胞膜貫通ドメイン、細胞内ドメインの 3 部位で構成されている。受容体にリガンドが結合すると EGFR は活性化し、細胞膜上を移動することで EGFR 同士または他の ERBB family 受容体(ERBB2 など)と結合して二量体化することで、細胞内に様々なシグナルを伝達する(Sharma *et al.*, 2007, Ronellenfitsch *et al.*, 2010)。悪性腫瘍組織で EGFR タンパク質の高発現が認められる患者は予後不良となる結果が得られている(Jaros *et*

al., 1992)。以上から、EGFR は悪性腫瘍の発症や成長に関与すると考えられ、最も注目されている分子である。また、脳腫瘍組織における EGFR 遺伝子解析によって、脳腫瘍には EGFR の全長配列から一部が欠損した variant が発現していることが明らかとなり、EGFR 遺伝子増幅が認められる脳腫瘍患者の 38%には EGFR の variant が発現していることが報告されている。EGFR variant には欠損する部分が異なる 5 つの variant が存在する(Frederick *et al.*, 2000, Nicholas *et al.*, 2006)。この 5 つの variant のうち、脳腫瘍組織に最も高頻度に検出される variant は、2~7 番目の exon が欠損した EGFR variant III (EGFRvIII)であり、EGFR variant を有する患者の 60~70%は EGFRvIII を有している(Nicholas *et al.*, 2006)。EGFRvIII は細胞外リガンド結合領域が欠損しているためリガンドが結合できないが、リガンドの結合なしに恒常的に活性化状態であることから細胞の腫瘍化に大きく関与していると考えられる(Batra *et al.*, 1995, Gan *et al.*, 2009)。また、EGFRvIII 発現細胞をマウスに接種して腫瘍を形成させた場合と、EGFR wild type をマウスに接種して腫瘍を形成させた場合とでは、腫瘍形成速度は EGFRvIII を接種した方がより速くなることが報告されている(Nishikawa *et al.*, 1994)。以上のように、EGFR の過剰発現や EGFRvIII の発現は腫瘍の悪性度に関与していると考えられる。

PDGFR には PDGFR α および PDGFR β が存在し、PDGFR α は悪性度の低い glioma から悪性度の高い glioma に至るまで発現が認められ、悪性度の高い glioma ほどそのリガンドの mRNA 発現が高いことが示されている(Hermanson *et al.*, 1992)。また、免疫染色法によって脳腫瘍組織における PDGFR α タンパク質発現が示されており、発現陽性患者は予後不良となる傾向が認められている(Varela *et al.*, 2004)。さらに、PDGFR α のリガンドである PDGF-B をマウス脳に高発現させることで、悪性腫瘍が形成される(Uhrbom *et al.*, 1998)。以上から、PDGF シグナル系は悪性腫瘍の発症や成長に大きく関与していると考えられる。

ERBB family に属する分子である ERBB2 は成人の正常脳での発現は認められないが glioma では発現が認められる(Mineo *et al.*, 2004)。さらに、glioma の悪性度上昇に伴い ERBB2 発現レベルが増加することが報告されている(Kristt and Yarden, 1996)。また、免疫染色法による悪性腫瘍組織での ERBB2 タンパク質発現解析の結果、ERBB2 の高発現が認められる患者は低発現患者と比較して予後不良であることが報告されている(Mineo *et al.*, 2007)。以上から、ERBB2 は悪性腫瘍の悪性度に関与すると考えられる。

以上のように、増殖因子受容体は腫瘍で高発現していることや悪性度との関与が示唆されていることから、その働きを選択的に阻害する分子標的薬が開発されている。一例を挙げると ERBB2 を標的とした trastuzumab、bcr-abl および c-kit を標的とした imatinib、EGFR を標的とした erlotinib, gefitinib などがある。分子標的薬は、その分子が腫瘍に発現し腫瘍の成長に寄与している場合に効果が期待できる。実際に imatinib についての臨床試験では、初めは脳腫瘍患者での有効性は認められなかったが、後に PDGFR α 陽性患者での効果を再解析したところ有効性が示されたという例がある(Mladkova and Chakravarti, 2009)。

従来の分子標的療法では、個々の標的分子に対して発現の有無を検査しており、また、腫瘍の種類によって発現解析が行われる標的分子が限られていた。従って、標的分子となり得る複数の分子の発現情報を同時に解析することが可能となれば、分子標的療法の治療薬選択の幅が広がり治療方針の決定に役立つ有用な情報が得られると考えられる。

第3節 抗癌剤感受性の変動に関与する因子の解明に向けた戦略

悪性腫瘍に対する抗癌剤感受性変動に関与する因子を同定するためには、第2節で述べたトランスポータータンパク質や増殖因子受容体の発現情報を得ることが不可欠である。しかし、これら分子は多数存在するため、個別解析では薬剤感受性に関与すると認められた分子でも、複数分子が絡んでいる腫瘍増殖システム全体としてみた場合は、必ずしも主な働きをしていない可能性がある。従って、多数の因子の中から抗癌剤感受性の変動に関与する主要な因子を明らかにする必要がある。そのため、本研究では以下の2点を考慮し、解析を行うこととした。

I. 発現解析を行う試料について

本研究では、悪性腫瘍に対する抗癌剤感受性の変動に関与する因子を同定するために、異なる性質を有する3種類の試料(悪性腫瘍培養細胞株、ヒト悪性腫瘍組織検体、悪性腫瘍 xenograft)を解析サンプルとして用いた。

In vitro 系培養細胞株は均一な性質を有することから単純なモデルであり、過剰発現細胞や siRNA によるノックダウンを行った細胞など各解析対象分子の機能解析が比較的容易であるという特徴を有する。また、トランスポータータンパク質による抗癌剤の細胞内蓄積量の解析等が容易に行うことができるため、本研究では薬剤感受性の変動に関与するトランスポーターを同定する目的で *in vitro* 系培養細胞株を解析サンプルとして使用した。

本研究では最終的に悪性腫瘍に対する個別化治療を見据えており、個別化治療を実現するためにはヒト悪性腫瘍組織検体における膜タンパク質の発現プロファイルを明らかにすることが不可欠である。そこで、悪性腫瘍患者から外科的手術によって摘出を行ったヒト悪性腫瘍組織検体を解析サンプルとして使用した。

In vitro 系培養細胞株の欠点として、単純なモデルであることから生体の性質を完全には反映していない。特に、EGFR に代表される増殖因子受容体は *in vitro* 系で細胞培養を行うと EGFR 遺伝子の増幅が低下することが報告されている (Gan *et al.*, 2013) ため、増殖因子受容体発現量と薬剤感受性との比較解析を行うにあたり最適なモデルであるとは言い難い。また、ヒト悪性腫瘍組織検体を用いた解析では生体そのものを解析可能であるという特徴を有するが、機能解析が困難であるという欠点も有する。これら 2 種類の試料の欠点を補うために、本研究では 3 つ目の試料としてヒト悪性腫瘍組織から作製した悪性腫瘍 xenograft を使用した。悪性腫瘍 xenograft を用いることでヒト悪性腫瘍組織検体の性質をより反映した状態で薬剤感受性との比較解析等を行うことが可能となっている。そこで、複数の膜タンパク質発現量と分子標的薬を含む抗癌剤感受性との比較解析を行うために悪性腫瘍 xenograft を解析サンプルとして使用した。

以上、本研究では異なる性質を有するこれら 3 種類の試料を用いてそれぞれの試料の長所を最大限利用することで、悪性腫瘍に対する抗癌剤感受性の変動に関与する因子を同定することとした。

II. タンパク質レベルでの解析について

悪性腫瘍に対する抗癌剤感受性の変動に関与する因子を同定するためには、第 2 節で述べたようなトランスポーターや増殖因子受容体など多数の膜タンパク質を発現解析対象とすべきである。そのため、発現解析には膜タンパク質の解析に応用可能なスループット性の高い手法を選択する必要がある。

発現解析の手法は大きく分けて mRNA レベルのものとタンパク質レベルのものに分けられる。mRNA レベルの発現解析手法としては、northern blotting 法、定量 PCR 法、DNA microarray 法などが挙げられる。その中でも DNA microarray 法は、ヒトゲノム上の全遺伝子に相当する数万分子の mRNA を解析可能である

ことから高い網羅性を誇る手法である。また、mRNA レベルの解析手法では一般に PCR による増幅が可能であるため、検出感度の面でもタンパク質レベルの解析手法を大きく上回り、極めて有力な解析ツールである。一方、遺伝子の機能実体は mRNA から翻訳されたタンパク質であるが、mRNA の発現量はタンパク質の発現量と必ずしも相関しないという例が報告されている(Chen *et al.*, 2002, Ohtsuki *et al.*, 2012)。また、mRNA 発現量とタンパク質の活性は相関しないが、タンパク質発現量と活性は相関するという報告は複数存在する(Molina-Arcas *et al.*, 2005, Lotfi *et al.*, 2006)。さらに、トランスポーターや増殖因子受容体などの膜タンパク質は機能を発揮する細胞コンパートメント、すなわち細胞膜上に局在しているタンパク質の量が極めて重要である。以上のことから、直接機能を反映する細胞内局在部位におけるタンパク質レベルでの発現解析を行うことが薬剤耐性・感受性の要因となる分子の同定に必須であると考えられる。

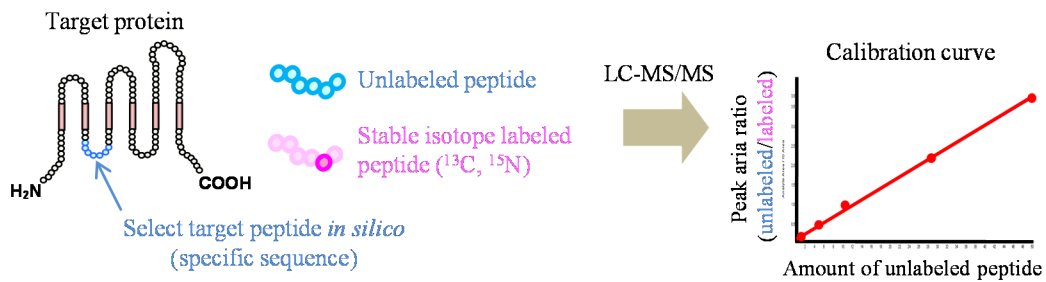
タンパク質レベルでの解析手法としては、抗体を用いた western blotting 法や ELISA 法および免疫染色法などがあり、抗体によっては非常に高感度なタンパク質の検出が可能である。しかし、抗体に依存するこれらの手法では抗体の交差性の問題を避けることができず、全てのタンパク質に感度の良い抗体が存在とは限らない。また、スループット性が低く、バイオマーカー探索のような大規模解析には適さない。大規模なタンパク質解析法にはこれまで広く用いられてきた手法である二次元電気泳動法(2D-PAGE)や質量分析装置を用いた shotgun proteomics などがある。しかし、2D-PAGE はタンパク質の状態での分離精製を必要とするため、膜タンパク質のような難溶性のタンパク質の解析には適さない。また、質量分析装置を用いた shotgun proteomics 法はより強く検出されたピークから優先して同定が行われるため、膨大なノイズペプチドによってトランスポーターのような微量タンパク質を検出することが困難であるという課題がある。ある報告では、腎糸球体に対して SDS-PAGE を組み合わせた shotgun

proteomics を行い、合計で 6686 タンパク質を同定していながら、その中に含まれる ABC トランスポーターは ABCB3 のみであった(Miyamoto *et al.*, 2007)。そのため、トランスポーターなどの膜タンパク質の発現解析を行うためには多量に存在するタンパク質に影響を受けない方法である必要がある。また、shotgun proteomics 法自体はタンパク質の同定法であり、サンプル間での相対定量しか行うことができない。一般的に LC-MS/MS によるピーク検出は再現性に乏しく、単純にピーク強度から得た定量値で議論することはできないため、何らかの標準リファレンス試料が無い限り異なる実験間での比較や多施設間での比較を行うことができない。さらに、同一分子間での相対定量値が得られるだけなので、異なるタンパク質間の発現量の大小を議論することができない。これらの問題点を解決するためにためには絶対定量法、すなわちサンプル中に標的タンパク質が何 fmol 存在するかを議論できる手法が必要である。

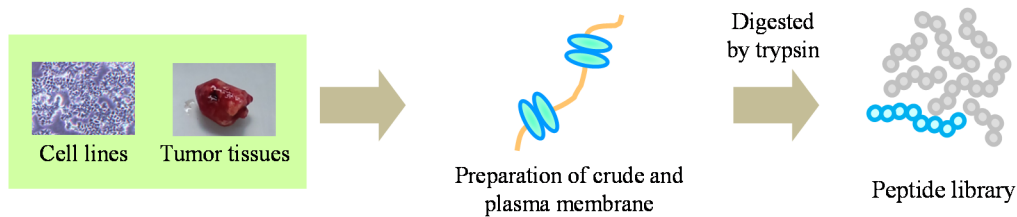
当研究室では高速液体クロマトグラフィー接続型タンデム質量分析装置 (LC-MS/MS) を用いたタンパク質多分子同時絶対定量法を膜タンパク質に応用し、トランスポーターを始めとする膜タンパク質同時絶対定量法による定量的標的プロテオミクスの手法を確立した(Kamiie *et al.*, 2008, Ohtsuki *et al.*, 2011, Uchida *et al.*, 2013)。本手法では、各タンパク質に特異的なアミノ酸配列を持つ標準ペプチドおよび安定同位元素標識した内標準ペプチドを合成し、生体試料タンパク質のトリプシン消化ペプチドを内標準法で定量する(Fig. 1-1)。トリプシン消化産物ペプチドを定量対象とすることで、2D-PAGE で問題となっていた膜タンパク質の脂溶性の高さについては克服することができる。また、質量分析装置としては、トリプルステージ四重極型 MS/MS システムの SRM/MRM (selected reaction monitoring/multiple reaction monitoring) mode を用いることで高感度な定量を可能にしている。SRM/MRM mode では質量分析装置の Q1 部でプリカーサーイオンの質量電荷比 m/z を、Q3 部でプロダクトイオンの m/z を選択す

る二重のフィルタリングによって夾雑物を排除し、S/N 比を向上させるため微量成分の定量に適している(**Fig. 1-1**)。また、本手法は標的分子に特異的な配列を定量対象としており、質量分析装置を用いることで 1 アミノ酸残基の違いから区別することが可能であるため、抗体を用いた解析手法で問題となる交差反応性もない。さらに、質量フィルター (channel, m/z) を高速に切り替えることで、複数のペプチドを 1 分析で検出することが可能である。本定量法を用いることでトランスポーターや増殖因子受容体などの膜タンパク質の網羅的かつ定量的な解析が可能であり、本法は解析対象サンプルの膜タンパク質の発現特性を明らかにするために適している。従って、LC-MS/MS を用いた膜タンパク質多分子同時絶対定量法は、膜タンパク質の中から薬剤感受性の変動に関与する分子を同定することに適した方法であると考えられる。

1) Synthesis of unlabeled and stable isotope labeled peptide.



2) Sample preparations



3) SRM/MRM analysis with LC-MS/MS

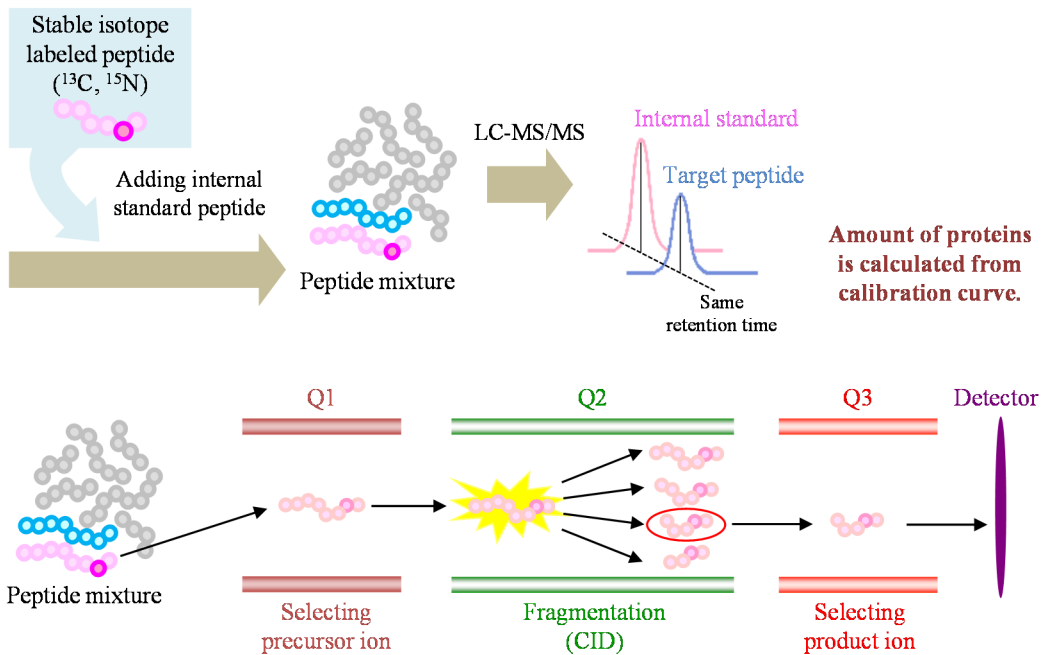


Fig. 1-1 Experimental procedures for absolute quantification of multiple proteins with LC-MS/MS

第4節 本研究の目的

本研究では、第3節で述べた戦略に従い悪性腫瘍における抗癌剤感受性変動の要因を明らかにすることを目指し、以下を本研究の目的とした。

1. 複数のトランスポータータンパク質発現量と抗癌剤感受性との比較解析を行うことで *in vitro* 系培養細胞株における薬剤感受性変動に関与するトランスポーターの同定を行うこと(第2章)
2. ヒト悪性腫瘍組織検体における膜タンパク質発現プロファイルを明らかにし個別化分子標的療法のターゲット候補分子の同定を行うこと(第3章)
3. 複数のタンパク質発現量と抗癌剤感受性との比較解析を行うことで悪性腫瘍 *xenograft line* における抗癌剤感受性変動に関与する膜タンパク質の同定を行うこと(第4章、第5章、第6章)

第2章 癌細胞パネルを用いた薬剤感受性変動に関与する因子の同定

第1節 序論

第1章で述べたように悪性腫瘍に対する化学療法の薬剤耐性には様々なトランスポータータンパク質が関与していると考えられている。そのため、癌細胞におけるトランスポーターの網羅的な発現量解析により薬剤耐性・感受性因子の同定を行うことができれば、化学療法における薬剤感受性を予測することが可能になり、臨床の場において効率的な抗癌剤の選択につながると考えられる。従って、本章では癌細胞株におけるトランスポーターの網羅的な絶対発現量解析により定量的発現プロファイルを明らかにし、抗癌剤に対する感受性との比較解析を行うことで抗癌剤感受性の個人差に関与するトランスポータータンパク質の同定を行うことを目的とした。

また、本章で発現解析を行うにあたり使用した癌細胞株は、財団法人癌研究会癌化学療法センター分子薬理部の矢守隆夫部長らによって確立された癌細胞パネルに含まれる癌細胞株である。この癌細胞パネルは39種類の培養癌細胞株を集めたものであり、これら癌細胞株の抗癌剤に対する薬剤感受性が一括してデータベース化されている(Yamori, 2003)。そのため、トランスポーターの発現量と薬剤感受性との関連性を研究するために非常に有用なツールとなっている。薬剤感受性はGI₅₀ (50%増殖阻害濃度)で表され、各抗癌剤の感受性は癌細胞株により異なり、GI₅₀ をパネル全体で示すとその薬剤に固有のパターン(fingerprint)を示すことが明らかとなっている。

この癌細胞パネルにおける非常に興味深い点として、fingerprint が類似する抗癌剤は作用機序がよく一致することが挙げられる。この結果から、新規抗癌剤の fingerprint をすでに作用機序の判明している抗癌剤の fingerprint と比較し、類似する fingerprint を有する抗癌剤が存在した場合、新規抗癌剤の作用機序はその

抗癌剤の作用機序と一致する可能性が高いと考えられる。実際、癌細胞パネルを用いることで、作用機序が不明であった抗癌物質 MS-247 の作用機序がトポイソメラーゼ I および II の阻害であることが予測され、その通りであることが証明されている(Yamori *et al.*, 1999)。また、癌細胞パネルの薬剤感受性データベースと遺伝子発現との比較解析も行われており、薬剤感受性と遺伝子発現との間に相関が認められることが報告されている。既知の相関も確かめられており、チミジル酸シンターゼの発現は 5-fluorouracil への感受性と負の相関性を示している(Dan *et al.*, 2002)。以上のことから、癌細胞株の薬剤感受性データベースの信頼性が高いことが証明されている。

本章では、この癌細胞パネルに含まれている細胞株 39 種類のうち、胃癌細胞株 6 種(St-4, MKN45, MKN1, MKN28, MKN7, MKN74)および乳癌細胞株 5 種(MCF-7, HBC-4, BSY-1, HBC-5, MDA-MB-231)を発現解析に使用した。これら胃癌および乳癌細胞株は、各細胞株間における薬剤感受性に大きな差が認められている(Yamori, 2003, Nakatsu *et al.*, 2005)。例えば、胃癌および乳癌細胞株では gemcitabine 感受性が 10000 倍感受性株と耐性株で異なり、乳癌細胞株では methotrexate 感受性が 3400 倍感受性株と耐性株で異なっている。細胞株間で薬剤感受性により差がある方が薬剤耐性に関与する因子を同定することが容易になると考えられるため、これらの細胞株を比較解析対象とした。

第2節 結果

2-2-1. 胃癌および乳癌細胞株におけるトランスポータータンパク質発現量

胃癌細胞株 6 種および乳癌細胞株 5 種から調製した crude membrane fraction に対して定量的標的プロテオミクスの手法を用い、90 種類の膜タンパク質の絶対発現量解析を行った。測定対象とした 90 種類の膜タンパク質には 34 種類の ABC トランスポータータンパク質、53 種類の SLC トランスポータータンパク質、2 種類の細胞膜マーカータンパク質(Na^+/K^+ ATPase, γ -gtp)、およびその他のタンパク質(RLIP76)が含まれている。発現解析の結果、胃癌細胞株においては 11 種類の膜タンパク質(MRP1, GLUT1, 4F2hc, LAT1, MCT1, RFC1, ENT1, ATA1, PCFT, Na^+/K^+ ATPase, γ -gtp)の発現が認められた(**Table 2-1**)。また、乳癌細胞株においては上記胃癌細胞株で発現が認められた膜タンパク質に加えて MRP5, BCRP, OATP3A1 の発現が認められた(**Table 2-2**)。なお、**Table 2-1** および **Table 2-2** で* を付けた定量値は各測定で設定した 4 つの SRM/MRM transition のうち 2 つの SRM/MRM transition でピークが検出されたものであり、信頼性に劣る定量値として記載している。GLUT1, 4F2hc, Na^+/K^+ ATPase に関しては今回解析を行った 11 種類の細胞株全てにおいて発現が認められた一方で、BCRP に関しては乳癌細胞株である HBC-5 のみにおいて発現が認められた。抗癌剤に対する薬剤耐性に関与すると知られている MDR1 を含むその他の 76 種類の膜タンパク質に関しては、全ての細胞株においてその発現量は定量限界以下であった(**Table 2-3**)。

Table 2-1 Expression levels of membrane proteins in crude membrane fraction of six human stomach cancer cell lines

	Quantitative values in stomach cancer cell lines (fmol/ μ g protein)					
	St-4	MKN45	MKN1	MKN28	MKN7	MKN74
<i>ABC transporter proteins</i>						
ABCC1 / MRP1	2.45 \pm 0.29	1.36 \pm 0.13*	0.588 \pm 0.072*	U.L.Q. (<0.151)	U.L.Q. (<0.156)	U.L.Q. (<0.197)
ABCC5 / MRP5	U.L.Q. (<0.620)	U.L.Q. (<0.756)	U.L.Q. (<0.425)	U.L.Q. (<0.235)	U.L.Q. (<0.280)	U.L.Q. (<0.445)
ABCG2 / BCRP	U.L.Q. (<0.467)	U.L.Q. (<0.311)	U.L.Q. (<0.692)	U.L.Q. (<0.706)	U.L.Q. (<0.744)	U.L.Q. (<0.972)
<i>SLC transporter proteins</i>						
SLC2A1 / GLUT1	55.0 \pm 5.3	30.3 \pm 2.7	14.8 \pm 1.6	286 \pm 10	149 \pm 5	179 \pm 12
SLC3A2 / 4F2hc	21.5 \pm 1.6	1.93 \pm 0.25	5.49 \pm 0.50	3.64 \pm 0.14	2.23 \pm 0.06	2.71 \pm 0.22
SLC7A5 / LAT1	2.93 \pm 0.64*	U.L.Q. (<0.242)	U.L.Q. (<0.301)	U.L.Q. (<0.255)	U.L.Q. (<0.376)	U.L.Q. (<0.356)
SLC16A1 / MCT1	2.40 \pm 0.46	0.929 \pm 0.097*	2.73 \pm 0.56*	U.L.Q. (<0.846)	U.L.Q. (<0.489)	U.L.Q. (<0.580)
SLC19A1 / RFC1	0.659 \pm 0.087	0.585 \pm 0.141	0.389 \pm 0.037*	0.450 \pm 0.147	0.189 \pm 0.053*	U.L.Q. (<0.0754)
SLCO3A1 / OATP3A1	U.L.Q. (<0.448)	U.L.Q. (<0.334)	U.L.Q. (<0.498)	U.L.Q. (<0.273)	U.L.Q. (<0.266)	U.L.Q. (<0.323)
SLC29A1 / ENT1	U.L.Q. (<0.388)	3.15 \pm 0.50*	U.L.Q. (<0.565)	U.L.Q. (<0.596)	U.L.Q. (<0.399)	U.L.Q. (<0.311)
SLC38A1 / ATA1	1.27 \pm 0.39*	0.917 \pm 0.126*	U.L.Q. (<0.440)	0.724 \pm 0.121*	1.98 \pm 0.56*	U.L.Q. (<0.317)
SLC46A1 / PCFT	1.60 \pm 0.09*	0.513 \pm 0.218*	U.L.Q. (<0.744)	0.558 \pm 0.048	0.400 \pm 0.118*	U.L.Q. (<0.242)
<i>Membrane marker proteins</i>						
Na ⁺ /K ⁺ ATPase	14.2 \pm 1.7	8.61 \pm 0.79	11.4 \pm 1.5	10.6 \pm 0.8	6.83 \pm 0.51	4.28 \pm 0.28
γ -gtp	1.31 \pm 0.09*	0.907 \pm 0.090*	U.L.Q. (<0.356)	U.L.Q. (<0.110)	U.L.Q. (<0.0920)	U.L.Q. (<0.117)

Crude membrane fraction of six human stomach cancer cell lines (St-4, MKN45, MKN1, MKN28, MKN7, MKN74) were analyzed by multiplexed-SRM/MRM analysis using LC-MS/MS. The expression amount of each molecule was determined as the average of 2 to 12 quantitative values from four SRM/MRM transitions in one to three analyses. Each value represents the mean \pm S.E.M. (n=2-12 SRM/MRM transitions). U.L.Q. means “under the limit of quantification” and the value in brackets following U.L.Q. represents the value of the quantification limit (fmol/ μ g protein).

*The reliability of the calculated values is considered to be less than that of other detected molecules, because in these cases only two among four SRM/MRM transitions gave detectable peak areas over 5000 counts.

Table 2-2 Expression levels of membrane proteins in crude membrane fraction of five human breast cancer cell lines

	Quantitative values in breast cancer cell lines (fmol/μg protein)				
	MCF-7	HBC-4	BSY-1	HBC-5	MDA-MB-231
<i>ABC transporter proteins</i>					
ABCC1 / MRP1	U.L.Q. (<0.315)	U.L.Q. (<0.125)	0.409 ± 0.002*	U.L.Q. (<0.123)	U.L.Q. (<0.310)
ABCC5 / MRP5	1.06 ± 0.16*	0.478 ± 0.047*	0.615 ± 0.173	U.L.Q. (<0.228)	0.887 ± 0.172*
ABCG2 / BCRP	U.L.Q. (<0.312)	U.L.Q. (<0.420)	U.L.Q. (<1.05)	3.95 ± 0.28	U.L.Q. (<0.391)
<i>SLC transporter proteins</i>					
SLC2A1 / GLUT1	18.7 ± 0.5	66.2 ± 1.9	21.8 ± 0.5	40.2 ± 1.5	41.8 ± 2.3
SLC3A2 / 4F2hc	62.2 ± 2.4	4.32 ± 0.51	5.10 ± 0.14	2.81 ± 0.23	3.61 ± 0.17
SLC7A5 / LAT1	3.85 ± 0.65	0.694 ± 0.121*	U.L.Q. (<0.312)	U.L.Q. (<0.256)	U.L.Q. (<0.365)
SLC16A1 / MCT1	U.L.Q. (<0.445)	U.L.Q. (<0.305)	U.L.Q. (<0.584)	U.L.Q. (<0.454)	U.L.Q. (<0.633)
SLC19A1 / RFC1	1.41 ± 0.33	0.887 ± 0.127	0.474 ± 0.127	0.952 ± 0.127	U.L.Q. (<0.192)
SLCO3A1 / OATP3A1	U.L.Q. (<0.165)	U.L.Q. (<0.233)	U.L.Q. (<0.228)	0.373 ± 0.076*	U.L.Q. (<0.176)
SLC29A1 / ENT1	3.28 ± 0.60	3.71 ± 0.32	0.678 ± 0.112*	2.32 ± 0.39	2.46 ± 0.64*
SLC38A1 / ATA1	0.938 ± 0.093	U.L.Q. (<0.174)	U.L.Q. (<0.326)	U.L.Q. (<0.179)	U.L.Q. (<0.169)
SLC46A1 / PCFT	Not measured.	0.334 ± 0.024*	0.320 ± 0.021*	0.663 ± 0.055	Not measured.
<i>Membrane marker proteins</i>					
Na ⁺ /K ⁺ ATPase	6.23 ± 0.42	12.2 ± 0.6	17.7 ± 1.2	27.2 ± 1.0	5.96 ± 0.34
γ-gtp	U.L.Q. (<0.129)	0.746 ± 0.178	U.L.Q. (<0.0866)	2.77 ± 0.38	U.L.Q. (<0.143)

Crude membrane fraction of five human breast cancer cell lines (MCF-7, HBC-4, BSY-1, HBC-5, MDA-MB-231) were analyzed by multiplexed-SRM/MRM analysis using LC-MS/MS. The expression amount of each molecule was determined as the average of 3 to 12 quantitative values from four SRM/MRM transitions in two or three analyses. Each value represents the mean ± S.E.M. (n=3-12 SRM/MRM transitions). U.L.Q. means “under the limit of quantification” and the value in brackets following U.L.Q. represents the value of the quantification limit (fmol/μg protein).

*The reliability of the calculated values is considered to be less than that of other detected molecules, because in these cases only two among four SRM/MRM transitions gave detectable peak areas over 5000 counts.

Table 2-3 Membrane proteins under the limit of quantification in crude membrane fraction of six human stomach cancer cell lines and five human breast cancer cell lines

<i>ABC transporter proteins</i>				
ABCA1 / ABC1	ABCA2 / ABC2	ABCA3 / ABC3	ABCA4 / ABCR	ABCA5
ABCA6	ABCA7	ABCA8	ABCA9	ABCA10 / ABC10
ABCA12 / ABC12	ABCA13 / ABC13	ABCB1 / MDR1	ABCB4 / MDR3	ABCB5
ABCB11 / BSEP	ABCC2 / MRP2	ABCC3 / MRP3	ABCC4 / MRP4	ABCC6 / MRP6
ABCC7 / CFTR	ABCC8 / SUR1	ABCC9 / SUR2	ABCC10 / MRP7	ABCC11 / MRP8
ABCC12 / MRP9	ABCC13	ABCG1 / White	ABCG4 / White2	ABCG5
ABCG8				
<i>SLC transporter proteins</i>				
SLC6A4 / SERT	SLC6A8 / CRT1	SLC10A1 / Ntcp	SLC10A2 / ASBT	SLC15A1 / PEPT1
SLC15A2 / PEPT2	SLC16A7 / MCT2	SLC21A2 / PGT	SLCO1A2 / OATP1A2	SLCO1B1 / OATP1B1
SLCO1B3 / OATP1B3	SLCO1C1 / OATP1C1	SLCO2B1 / OATP2B1	SLCO4A1 / OATP4A1	SLCO4C1 / OATP4C1
SLCO5A1 / OATP5A1	SLCO6A1 / OATP6A1	SLC22A1 / OCT1	SLC22A2 / OCT2	SLC22A3 / OCT3
SLC22A4 / OCTN1	SLC22A5 / OCTN2	SLC22A6 / OAT1	SLC22A7 / OAT2	SLC22A8 / OAT3
SLC22A9 / UST3	SLC22A10 / OAT5	SLC22A11 / OAT4	SLC22A12 / URAT1	SLC22A13 / OCTL1
SLC22A14 / OCTL2	SLC22A15 / FLIPT1	SLC22A16 / CT2	SLC22A18	SLC28A1 / CNT1
SLC28A2 / CNT2	SLC28A3 / CNT3	SLC29A2 / ENT2	SLC29A4 / PMAT	SLC47A1 / MATE1
SLC47A2 / MATE2	SLC47A2 / MATE2k	SLC51A1 / OST α	SLC51A1BP / OST β	
<i>Other molecules</i>				
RLIP76				

Crude membrane fractions of six human stomach cancer cell lines (St-4, MKN45, MKN1, MKN28, MKN7, MKN74) and five human breast cancer cell lines (MCF-7, HBC-4, BSY-1, HBC-5, MDA-MB-231) were examined by multiplexed-SRM/MRM analysis using LC-MS/MS.

2-2-2. 胃癌細胞株における MRP1 発現量と抗癌剤感受性の比較解析

MRP1 は vincristine, doxorubicin, epirubicin, methotrexate などの様々な抗癌剤を細胞外へと排出することがこれまでに報告されており (Zeng *et al.*, 2001, Nunoya *et al.*, 2003, Garrido *et al.*, 2011)、胃癌細胞株 6 種のうち 3 種類で発現が認められた一方で乳癌細胞株 5 種のうちでは 1 種類のみで発現が認められた。胃癌細胞株 6 種の間では少なくとも 16.2 倍の MRP1 発現量差が認められ、これは GLUT1 (19.3 倍の発現量差) に続いて 2 番目に発現量の差が大きい膜タンパク質であった (Table 2-1)。

Fig. 2-1 に示す通り、MRP1 の発現が認められた胃癌細胞株 (St-4, MKN45, MKN1) において MRP1 発現量および 5 種類の抗癌剤に対する感受性 ($|\log_{10}GI_{50}|$) との間に高い負の相関性が認められた (etoposide: $r=-0.994$, vincristine: $r=-0.994$, epirubicin: $r=-0.986$, vinblastine: $r=-0.964$, doxorubicin: -0.952)。なお、抗癌剤に対する感受性を示す値である $|\log_{10}GI_{50}|$ は癌細胞パネルの薬剤感受性データベースから引用し (Nakatsu *et al.*, 2005)、これら 5 種類の抗癌剤の構造式は Fig. 2-2 に示した。また、MRP1 の発現が認められなかった胃癌細胞株 (MKN28, MKN7, MKN74) では GLUT1 が高発現している (>149 fmol/ μ g protein) ことが認められた一方で、MRP1 の発現が認められた細胞株 (St-4, MKN45, MKN1) では GLUT1 発現量が相対的に低い (14.8-55.0 fmol/ μ g protein) ことが認められた (Table 2-1)。

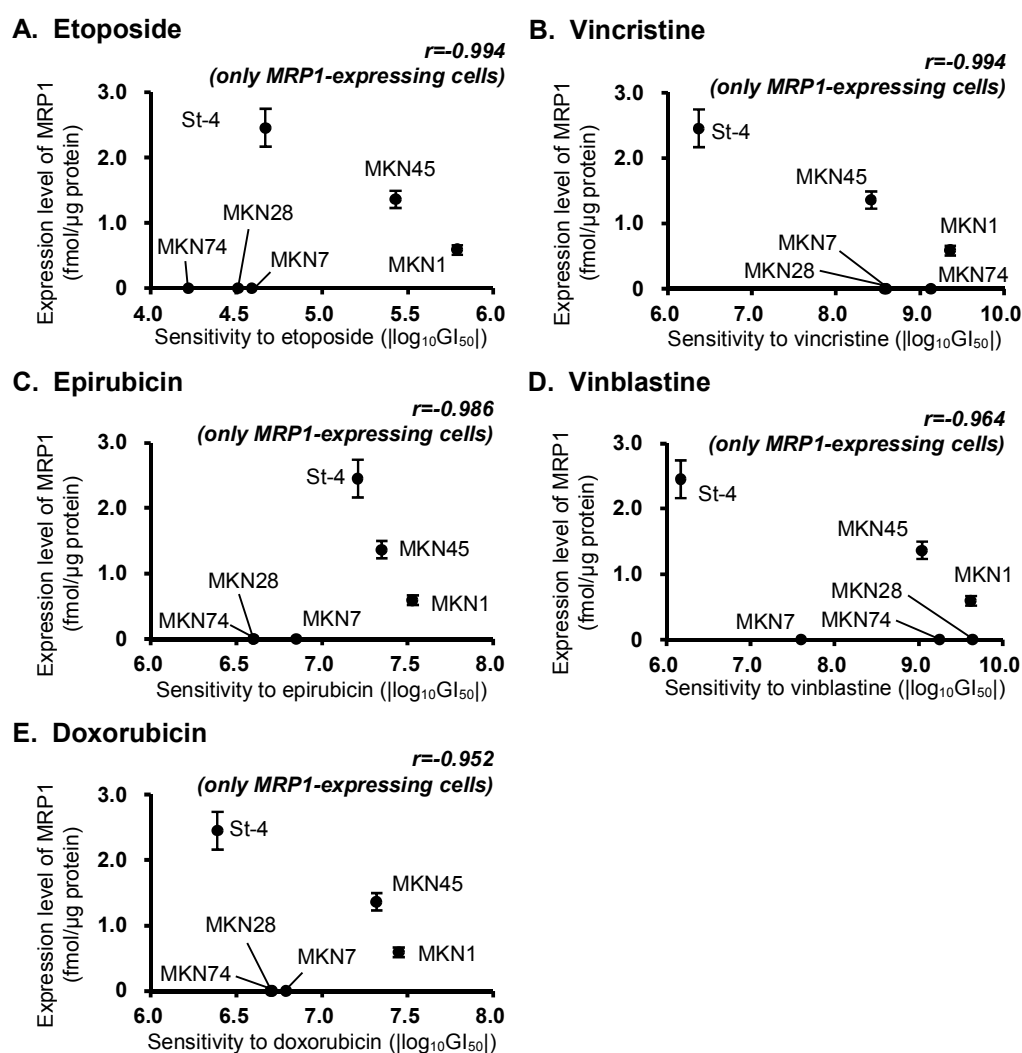
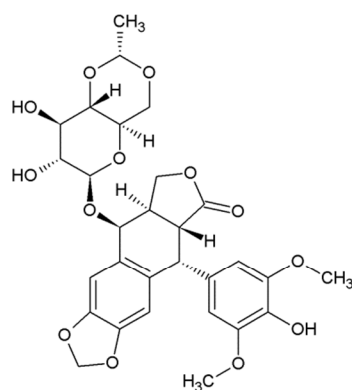


Fig. 2-1 Correlation between protein expression level of MRP1 and drug sensitivity of six human stomach cancer cell lines

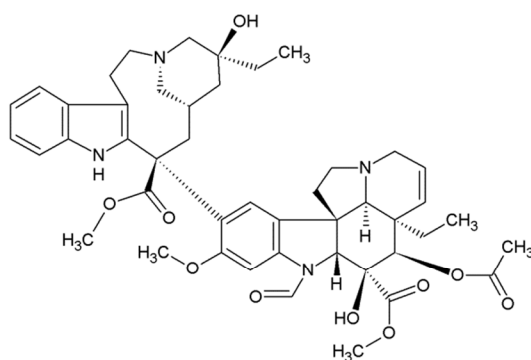
Chemosensitivity to anticancer drugs (etoposide, vincristine, epirubicin, vinblastine, doxorubicin) was obtained from a database of chemosensitivities of a panel of human cancer cell lines (Nakatsu *et al.*, 2005). The GI_{50} value is 50% growth-inhibitory concentration. Each dot and bar on the Y-axis represents the mean \pm S.E.M. ($n=1-3$).

The correlation coefficient (r) in this figure refers only to the three MRP1-expressing cell lines (St-4, MKN1, MKN45).

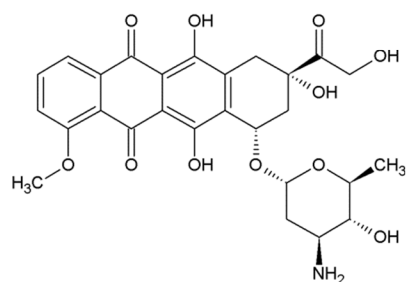
A. Etoposide



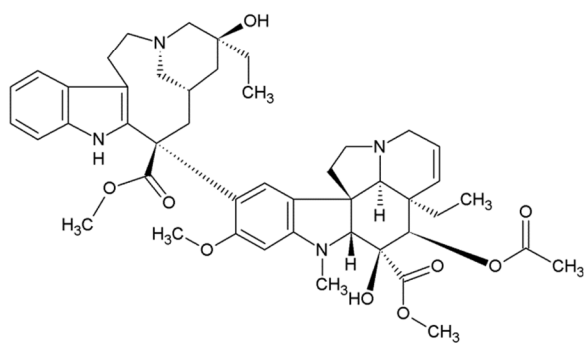
B. Vincristine



C. Epirubicin



D. Vinblastine



E. Doxorubicin

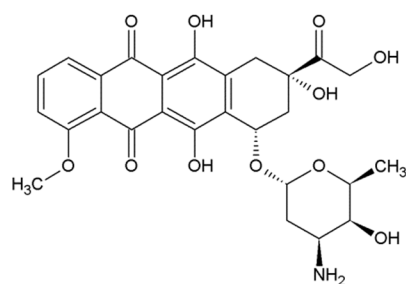


Fig. 2-2 Structure of five anticancer drugs (etoposide, vincristine, epirubicin, vinblastine, doxorubicin)

2-2-3. 胃癌細胞株における etoposide 感受性に対する MRP1 発現の影響

Fig. 2-1 および **Fig. 2** に示した抗癌剤の中でも etoposide に関しては胃癌の化学療法で使用されていることが報告されている (Morant, 2001, Lage, 2003)。Etoposide 耐性への MRP1 の関与を検証するために MRPs を介した輸送を阻害する MK571 を MRPs 阻害剤として用い (Leier *et al.*, 1996)、etoposide の細胞内蓄積量測定および etoposide 感受性測定を行った。

まずは MRP1 発現量が胃癌細胞株における etoposide 細胞内蓄積量に影響を与えるかを検証するため、MRP1 が発現している胃癌細胞株 (St-4, MKN45, MKN1) を用いて定常状態 (48 hr) における etoposide の cell to medium ratio (C/M ratio) を MK571 存在下および非存在下の両条件で LC-MS/MS を用いて測定した。50 μ M の MK571 を細胞に処理することで 3 種類の胃癌細胞株全てにおいて etoposide の C/M ratio は増加した (**Fig. 2-3A**)。さらに、MRP1 による etoposide 排出クリアランスを反映する値である $1/(C/M_{ss} \text{ ratio}) - 1/(C/M_{ss} \text{ ratio}_{MK571})$ が MRP1 発現量と良好な正の相関性 ($r=0.998$) を示した (**Fig. 2-3B**)。

次に、MRP1 を阻害することによって etoposide に対する感受性が変化するかを検証するため、MRP1 が発現している胃癌細胞株 (St-4, MKN45, MKN1) を用いて etoposide を 72 時間処理した後に etoposide に対する IC₅₀ の測定を行った。50 μ M の MK571 を細胞に処理することで 3 種類の胃癌細胞株全てにおいて etoposide に対する IC₅₀ が減少し、etoposide に対する感受性が増加した (**Table 2-4**)。さらに、MRP1 発現量が低い胃癌細胞株 (MKN1) と比較して MRP1 の発現量が高い胃癌細胞株 (St-4, MKN45) において IC₅₀ の減少量が高いことが認められた。

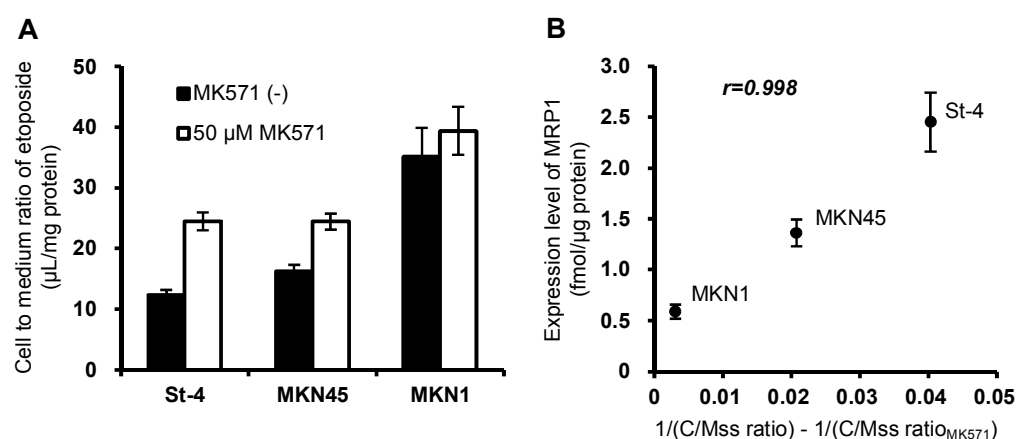


Fig. 2-3 Effect of MK571 on the uptake amount of etoposide in three human stomach cancer cell lines

Three human stomach cancer cell lines (St-4, MKN45, MKN1) were incubated at 37°C for 48 hours in uptake medium containing 1 μM etoposide with or without 50 μM MK571, a MRPs inhibitor. Uptake amount of etoposide was measured by HPLC-MS/MS and was expressed as cell-to-medium ratio (C/M ratio, μL/mg protein). (A) Effect of MK571 on the uptake amount of etoposide in three human stomach cancer cell lines. Each column represents the mean ± S.E.M. (n=4). (B) Correlation between $1/(C/Mss \text{ ratio}) - 1/(C/Mss \text{ ratio}_{MK571})$ and expression level of MRP1. Each dot and bar on the Y-axis represents the mean ± S.E.M. (n=3).

Table 2-4 Effect of MK571 on the chemosensitivity of three human stomach cancer cell lines to etoposide

Cell line	IC ₅₀ (μM) of etoposide		Control/MK571 ratio of IC ₅₀	MRP1 expression (fmol/μg protein)
	Control	50 μM MK571		
St-4	63.2	6.15	10.3	2.45 ± 0.29
MKN45	34.3	2.97	11.5	1.36 ± 0.13
MKN1	12.6	2.23	4.24	0.588 ± 0.072

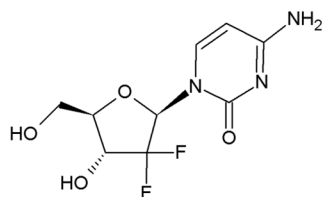
Three human stomach cancer cell lines (St-4, MKN45, MKN1) were exposed for 72 hours to various concentrations of etoposide with or without 50 μM MK571, a MRPs inhibitor. Control was etoposide exposure without MK571. The IC₅₀ value was determined by plotting the percentage cell viability versus the concentration of etoposide. Each value of MRP1 expression represents the mean ± S.E.M. (n=4).

2-2-4. 乳癌細胞株におけるトランスポータータンパク質発現量と抗癌剤感受性の比較解析

癌細胞パネルの薬剤感受性データベースから、今回解析を行った 5 種類の乳癌細胞株の間で gemcitabine (最大 1.00×10^4 倍の感受性差)および MTX (最大 3.39×10^3 倍の感受性差)に対する感受性に大きな差が認められることが分かっている(Nakatsu *et al.*, 2005)。なお、gemcitabine および MTX の構造式に関しては **Fig. 2-4** に示した。**Fig. 2-5** に示す通り、5 種類の乳癌細胞株における gemcitabine に対する感受性は 4F2hc ($r=0.781$)および MRP5 ($r=0.721$)と高い相関性を示した(**Fig. 2-5A, B**)。しかし、gemcitabine 感受性と 4F2hc 発現量との間には高い相関係数 ($r=0.781$)が認められたが、4F2hc は MCF-7 細胞株のみで非常に高発現しており ($62.2 \text{ fmol}/\mu\text{g protein}$)、その他の 4 種類の乳癌細胞株では相対的に低発現している ($2.81\text{-}5.10 \text{ fmol}/\mu\text{g protein}$)ことが認められた(**Fig. 2-5A**)。

乳癌細胞株における抗癌剤感受性と膜タンパク質発現量との間の高い相関性は MTX に対する感受性と RFC1 ($r=0.690$)および ENT1 ($r=0.566$)との間にも認められた(**Fig. 2-5C, D**)。**Fig. 2-5C** に示す通り、HBC-5 細胞株を除外すると MTX 感受性と RFC1 発現量との間には非常に高い正の相関性($r=0.965$)が認められた。この結果から、RFC1 はこれら乳癌細胞株(MCF-7, HBC-4, BSY-1, MDA-MB-231)における MTX 感受性に対して主に関与する膜タンパク質と考えられ、一方で HBC-5 細胞株における MTX 感受性にはその他の因子が関与していると考えられた。

A. Gemcitabine



B. Methotrexate

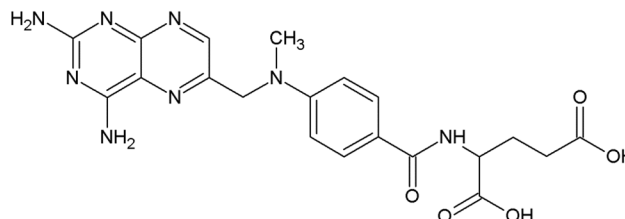
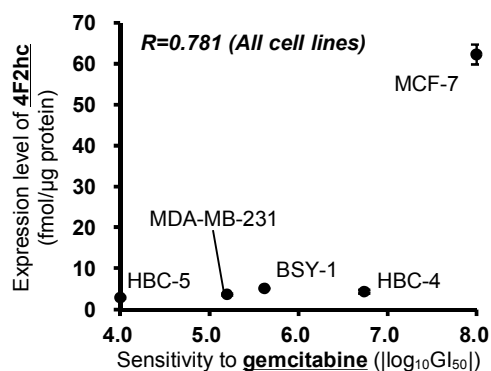
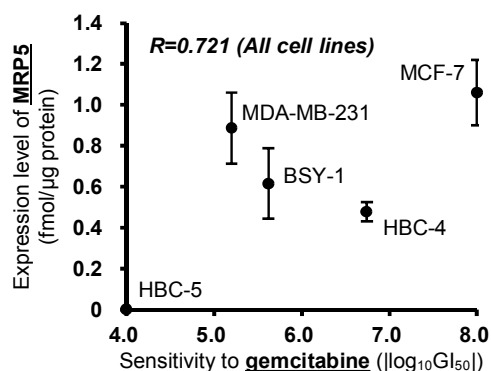


Fig. 2-4 Structure of gemcitabine and methotrexate

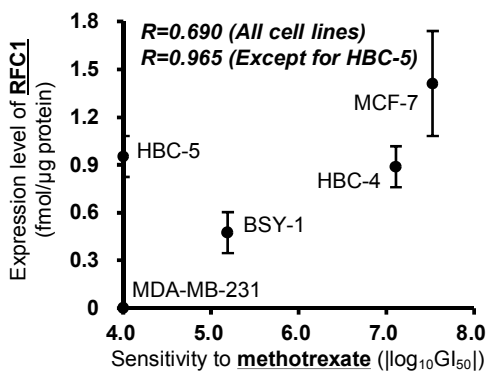
A. 4F2hc vs Gemcitabine



B. MRP5 vs Gemcitabine



C. RFC1 vs Methotrexate



D. ENT1 vs Methotrexate

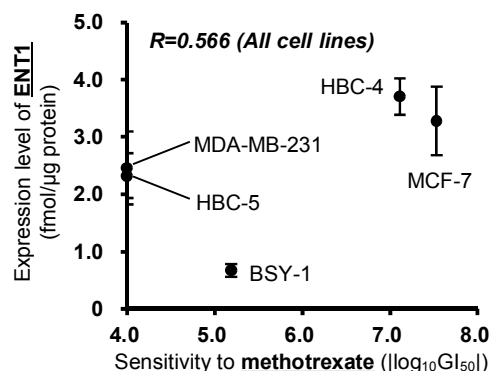


Fig. 2-5 Correlation between anti-cancer drug sensitivity and protein expression level in five human breast cancer cell lines

Chemosensitivity to MTX and gemcitabine was obtained from a database of chemosensitivities of a panel of human cancer cell lines (Nakatsu *et al.*, 2005). The GI_{50} value is the 50% growth-inhibitory concentration. Dots and bars on the Y-axis represent the mean \pm S.E.M. ($n=3$).

2-2-5. 乳癌細胞株における methotrexate 感受性に対する RFC1 発現の影響

乳癌細胞株における MTX 耐性への RFC1 の関与を検証するために ^3H]MTX の細胞内蓄積量測定を行った。まずは ^3H]MTX 初期取り込み過程における RFC1 の関与を検証するため、5 種類の乳癌細胞株(MCF-7, HBC-4, BSY-1, HBC-5, MDA-MB-231)に対し 0.5 $\mu\text{Ci}/200\ \mu\text{L}$ (90 nM)の ^3H]MTX を 3, 10, 30 min 処理し、 ^3H]MTX の放射活性を用いて C/M ratio を算出した。5 種類の乳癌細胞株それぞれの ^3H]MTX 初期取り込み過程(3, 10, 30 min)において、時間依存的に ^3H]MTX の C/M ratio の増加が認められた(**Fig. 2-6A**)。また、HBC-5 細胞株を除いた 4 種類の乳癌細胞株(MCF-7, HBC-4, BSY-1, MDA-MB-231)では、3 min および 10 min における ^3H]MTX の C/M ratio から算出した ^3H]MTX 初期取り込み速度は RFC1 発現量($r=0.861$)および MTX 感受性($r=0.956$)とそれぞれ高い相関性を示した(**Fig. 2-6B, C**)。

次に、定常状態における ^3H]MTX 細胞内蓄積量に対する RFC1 の関与を検証するため、5 種類の乳癌細胞株(MCF-7, HBC-4, BSY-1, HBC-5, MDA-MB-231)に対し 0.5 $\mu\text{Ci}/1\ \text{mL}$ (18 nM)の ^3H]MTX を 48 hr 処理し、初期取り込み測定と同様に ^3H]MTX の放射活性を用いて C/M ratio を算出した。HBC-5 細胞株を除いた 4 種類の乳癌細胞株(MCF-7, HBC-4, BSY-1, MDA-MB-231)では、定常状態(48 hr)における ^3H]MTX の C/M ratio は RFC1 発現量($r=0.982$)および MTX 感受性($r=0.919$)とそれぞれ高い相関性を示した(**Fig. 2-7**)。なお、HBC-5 細胞株は定常状態における ^3H]MTX の C/M ratio が解析を行った 5 種類の乳癌細胞株の中でも高い(202 $\mu\text{L}/\text{mg protein}$)にも関わらず MTX に対しては耐性であることが認められたため (**Fig. 2-7B**)、RFC1 およびその他のトランスポータータンパク質以外の因子が HBC-5 細胞株の MTX 感受性に関与していることが示唆された。

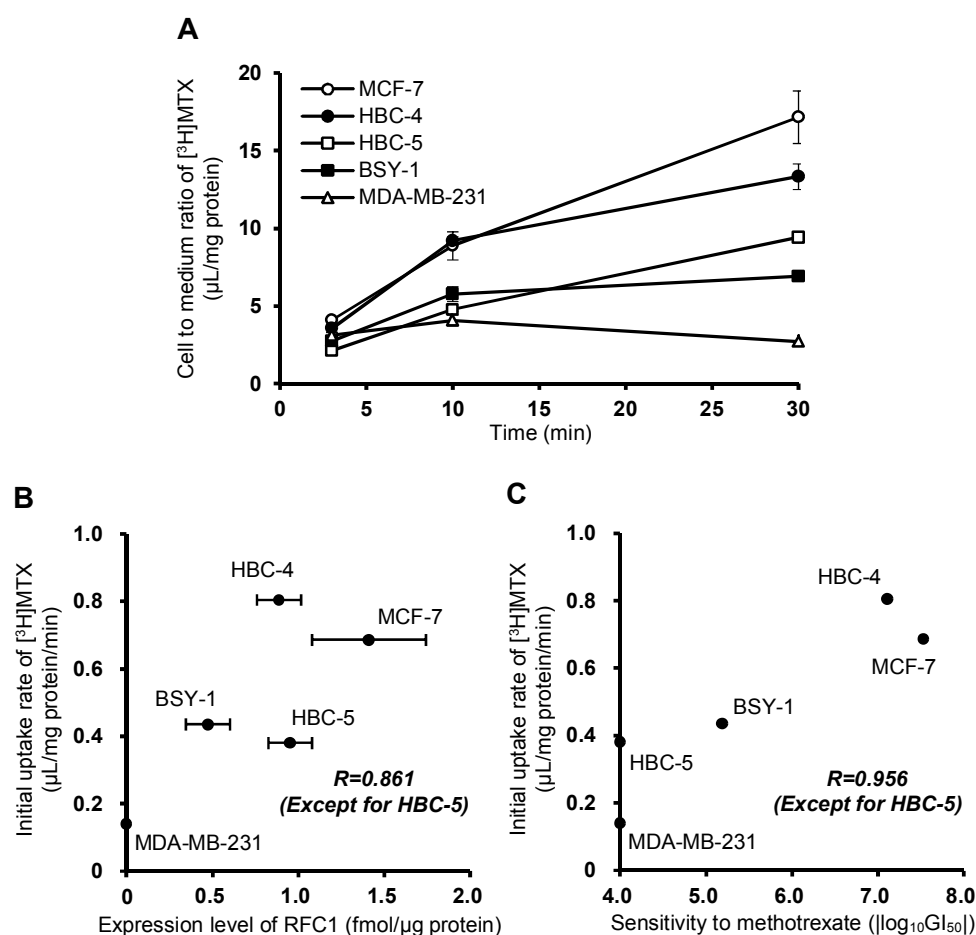


Fig. 2-6 Correlation of initial uptake of $[^3\text{H}]\text{MTX}$ to RFC1 protein level or sensitivity to MTX in five human breast cancer cell lines

Five human breast cancer cell lines (MCF-7, HBC-4, BSY-1, HBC-5, MDA-MB-231) were incubated at 37°C for 3, 10, and 30 min in uptake medium containing $0.5 \mu\text{Ci}/200 \mu\text{L}$ (90 nM) of $[^3\text{H}]\text{MTX}$. (A) Time dependent manner of C/M ratio of $[^3\text{H}]\text{MTX}$ under the initial uptake condition. Each dot and bar represent the mean \pm S.E.M. ($n=4$) (B) Correlation between initial uptake rate of $[^3\text{H}]\text{MTX}$ and RFC1 expression in five human breast cancer cell lines. Each dot and bar represent the mean \pm S.E.M. (X-axis: $n=3$, Y-axis: $n=4$). (C) Correlation between initial uptake rate of $[^3\text{H}]\text{MTX}$ and chemosensitivity to MTX. Chemosensitivity to MTX was obtained from a database of chemosensitivities of a panel of human cancer cell lines (Nakatsu *et al.*, 2005). The GI_{50} value is 50% growth-inhibitory concentration. Each dot on the Y-axis represents the mean ($n=4$).

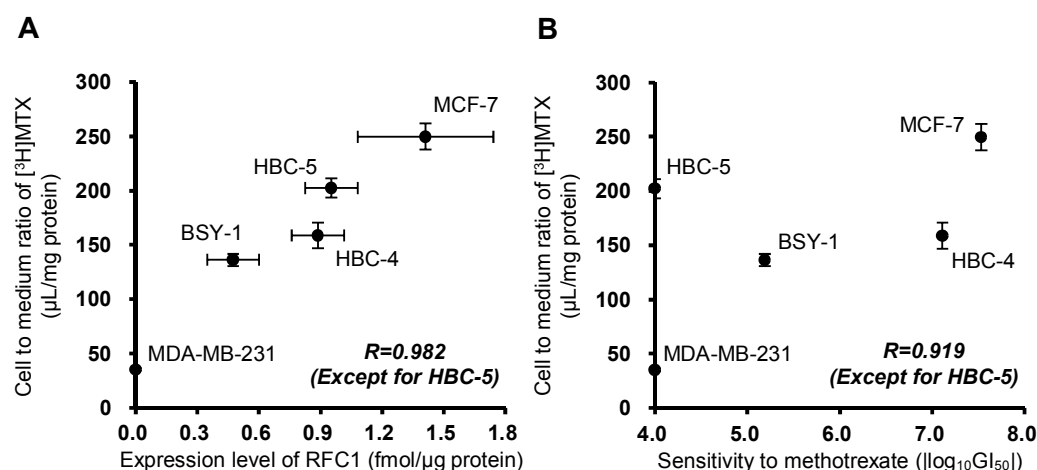


Fig. 2-7 Correlation of intracellular amount of [³H]MTX in the steady state to RFC1 protein expression level or MTX sensitivity of five human breast cancer cell lines

Five human breast cancer cell lines (MCF-7, HBC-4, BSY-1, HBC-5, MDA-MB-231) were incubated at 37°C for 48 hours in uptake medium containing 0.5 μCi/1 mL (18 nM) of [³H]MTX. Intracellular amount of [³H]MTX was expressed as cell-to-medium ratio (μL/mg protein). (A) Correlation between intracellular amount of [³H]MTX and RFC1 protein expression level in a steady-state condition for five human breast cancer cell lines. Each dot and bar represent the mean ± S.E.M. (X-axis: n=3, Y-axis: n=4). (B) Correlation between intracellular amount of [³H]MTX and chemosensitivity to MTX in a steady-state condition. Chemosensitivity to MTX was obtained from a database of chemosensitivities of a panel of human cancer cell lines (Nakatsu *et al.*, 2005). The GI_{50} value is 50% growth-inhibitory concentration. Each dot on the Y-axis represents the mean (n=4).

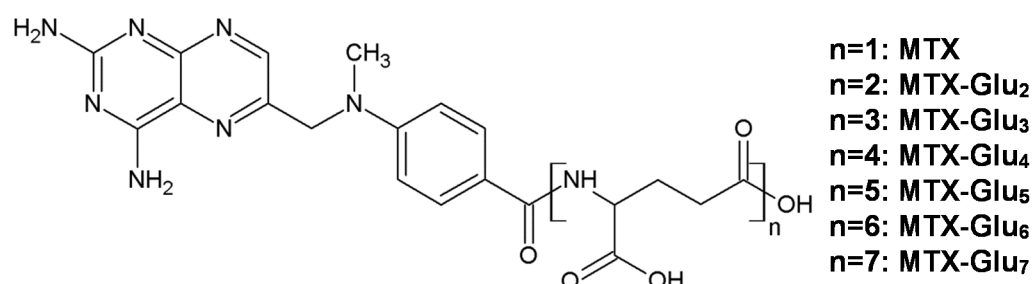


Fig. 2-8 Structure of methotrexate polyglutamate

2-2-6. 乳癌細胞株における methotrexate 代謝関連酵素発現量

前述した通り、乳癌細胞株の中でも HBC-5 細胞株における MTX 感受性はトランスポータータンパク質のみでは説明ができないことが示唆された。また、 $[^3\text{H}]\text{MTX}$ の C/M ratio は放射活性を用いて算出しているため、この C/M ratio は細胞内での $[^3\text{H}]\text{MTX}$ 代謝物も含めた値であると考えられる。MTX は細胞内へと取り込まれた後にポリグルタミル化を受けることで能動輸送による細胞外への排出の影響を受けにくくなり、結果として MTX の薬効が増強されることが報告されている(Cole *et al.*, 2001)。なお、MTX ポリグルタミル化体の構造を **Fig. 2-8** に示す。**Fig. 2-9** に示す通り、MTX のポリグルタミル化を行う酵素として FPGS が、逆に脱グルタミル化を行う酵素として GGH が報告されている(Waltham *et al.*, 1997)。このように MTX 感受性には MTX の細胞内代謝も関与している可能性があるため、MTX の代謝酵素である FPGS および GGH、そして MTX の標的酵素である DHFR の絶対発現量解析を行った。

解析対象として HBC-5 細胞株に加え、HBC-5 細胞株と定常状態における $[^3\text{H}]\text{MTX}$ の C/M ratio が同程度である一方で MTX に対して 1290 倍感受性が高い HBC-4 細胞株について whole cell lysate におけるこれら MTX 代謝関連酵素の絶対発現量解析を行った。**Table 2-5** 上段に示す通り、両細胞株(HBC-4, HBC-5)において DHFR および FPGS の発現が認められたが有意な発現量差は認められなかった。FPGS に関しては定量限界以下(0.330 fmol/ μg protein)の発現であったため、SDS-PAGE で分離後に in-gel digestion 法を用いてサンプルに含まれる夾雑物量を減少させた後に発現量解析を行った(**Fig. 2-10**)。なお、in-gel digestion を行うにあたり gel の切り出しは FPGS の分子量(64.6 kDa)が含まれる 50-75 kDa の範囲で行った。**Table 2-5** 下段に示す通り、両細胞株において FPGS の発現が検出され、MTX 感受性細胞である HBC-4 細胞株における FPGS の発現量は MTX 耐性細胞株である HBC-5 細胞株と比較して 2.38 倍高いことが認められた。

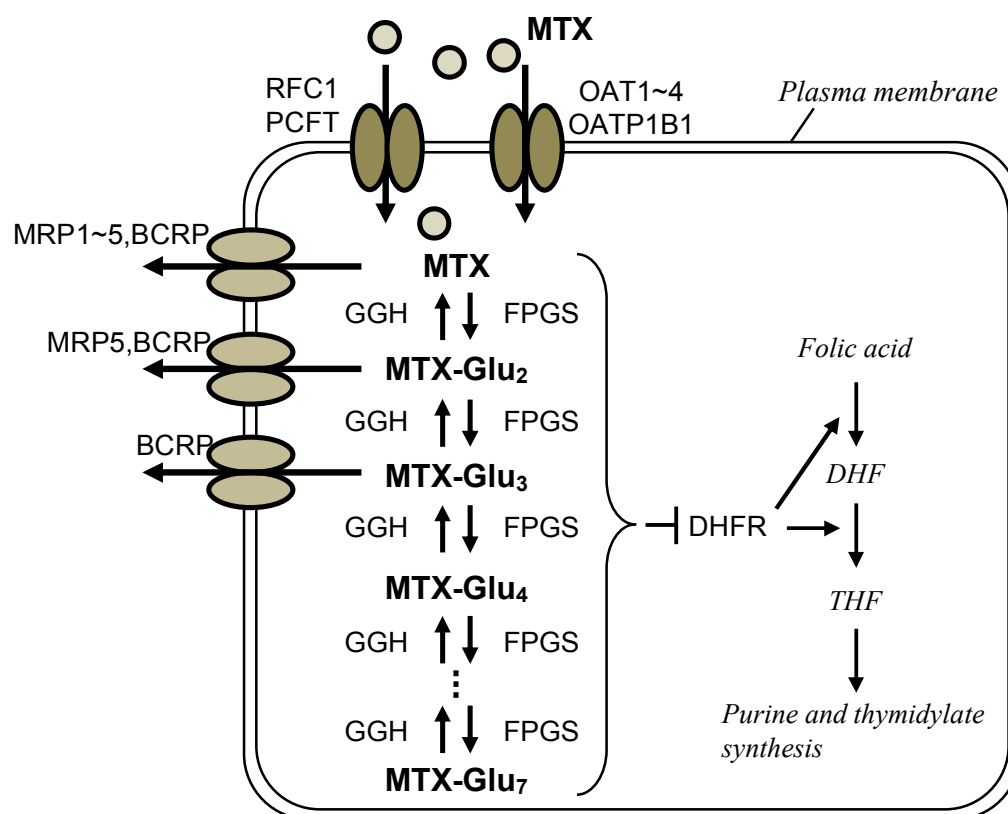


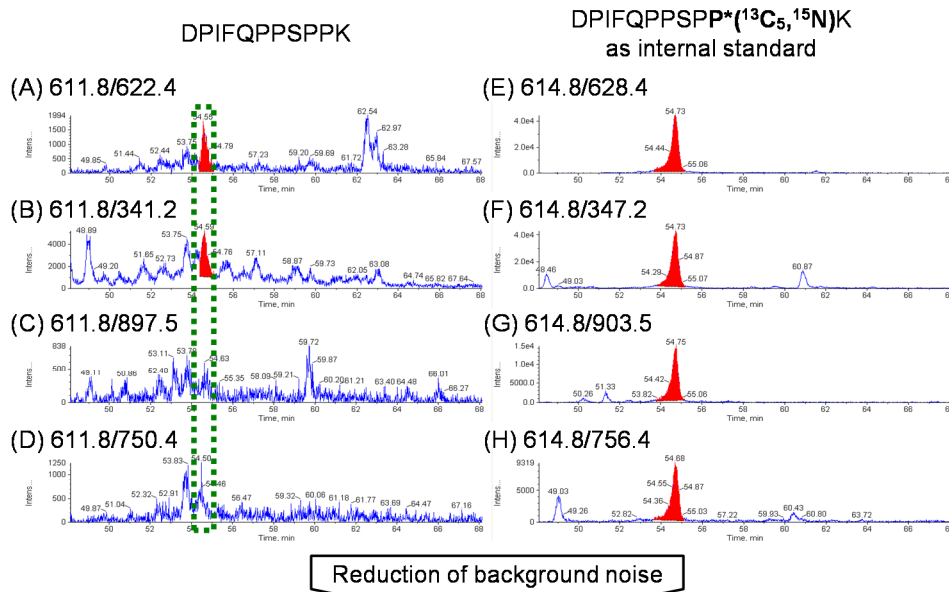
Fig. 2-9 Intracellular accumulation of methotrexate polyglutamate and mode of action for methotrexate

Table 2-5 Expression levels of metabolic enzymes of methotrexate in whole cell lysate of methotrexate resistant and sensitive human breast cancer cell lines

	Quantitative values (fmol/ μ g protein)		Expression ratio HBC-4/HBC-5
	HBC-4 (sensitive to MTX)	HBC-5 (resistant to MTX)	
DHFR	0.859 \pm 0.019	0.842 \pm 0.026	1.02
FPGS	U.L.Q. (< 0.327)	U.L.Q. (< 0.330)	-
GGH	1.25 \pm 0.06	1.18 \pm 0.05	1.06
<i>In-gel digested sample</i>			
FPGS	0.525 \pm 0.170	0.221 \pm 0.046	2.38

Whole cell lysates of two human breast cancer cell lines (HBC-4 and HBC-5) were digested with trypsin. Proteins of whole cell lysate for in-gel trypsin digestion were separated by SDS-PAGE, and the gel bands (50-75 kDa) were cut out for in-gel trypsin digestion. Tryptic digest of each cell line was analyzed by multiplexed-SRM/MRM with LC-MS/MS. The amount of each protein was determined as the average of 5 to 12 quantitative values from four SRM/MRM transitions in two or four analyses. Each value represents the mean \pm S.E.M. (n=5-12 SRM/MRM transitions). U.L.Q. means “under the limit of quantification” and the value in brackets following U.L.Q. represents the value of the quantification limit (fmol/ μ g protein).

1) Trypsin digestion ⇒ LC-MS/MS (57.1 µg/injection)



2) SDS-PAGE ⇒ In-gel trypsin digestion ⇒ LC-MS/MS (222 µg/injection)

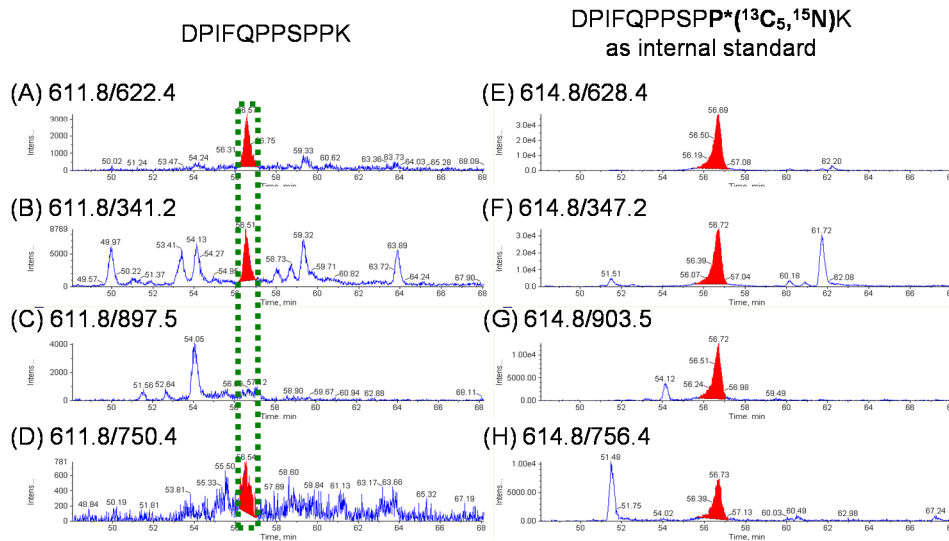


Fig. 2-10 Identification of FPGS in whole cell lysate of human breast cancer cell line after in-gel digestion method

Whole cell lysate of human breast cancer cell line (HBC-5) were digested with trypsin. Proteins of whole cell lysate for in-gel trypsin digestion were separated by SDS-PAGE, and the gel bands (50-75 kDa) were cut out for in-gel trypsin digestion. Tryptic digests were analyzed by multiplexed-SRM/MRM analysis using LC-MS/MS. (A-D) Chromatograms of four SRM/MRM transitions for non-labeled peptide (DPIFQPPSPPK) of FPGS. (E-H) SRM/MRM chromatograms of four MRM transitions for stable isotope labeled peptide (DPIFQPPSPP*(¹³C₅,¹⁵N)K). Filled peaks were the peaks identified as specific signals. The m/z values (Q1/Q3) of the SRMs/MRMs were A: 611.8/622.4, B: 611.8/341.2, C: 611.8/897.5, D: 611.8/750.4, E: 614.8/628.4, F: 614.8/347.2, G: 614.8/903.5, H: 614.8/756.4

2-2-7. 乳癌細胞株における methotrexate ポリグルタミル化体の細胞内蓄積量

前述した通り、MTX ポリグルタミル化酵素である FPGS の発現量は HBC-4 細胞株と比較して MTX 耐性細胞株である HBC-5 細胞株で低発現していた(**Table 2-5**)。実際に HBC-5 細胞株では MTX のポリグルタミル化が阻害されているかを検証するため、HBC-4 および HBC-5 の両細胞株に対し MTX を 24 hr 処理し、定常状態での MTX および MTX ポリグルタミル化体(MTX-Glu₂~MTX-Glu₇)の細胞内蓄積量を LC-MS/MS を用いて測定した。その結果、MTX~MTX-Glu₅ は両細胞株で蓄積が認められ、MTX-Glu₆ は HBC-4 細胞株のみで蓄積が認められた(**Fig. 2-11A**)。なお、MTX-Glu₇ に関しては両細胞株で蓄積が検出されなかった。また、**Fig. 2-11B** に示す通り、HBC-5 細胞株における MTX 細胞内蓄積量は HBC-4 細胞株と比較して 2.01 倍であった。しかし、MTX のポリグルタミル化が進行するに伴い(MTX→MTX-Glu₆)、その相対蓄積量は MTX 耐性細胞株である HBC-5 細胞株で減少していくことが認められた(**Fig. 2-11B**)。

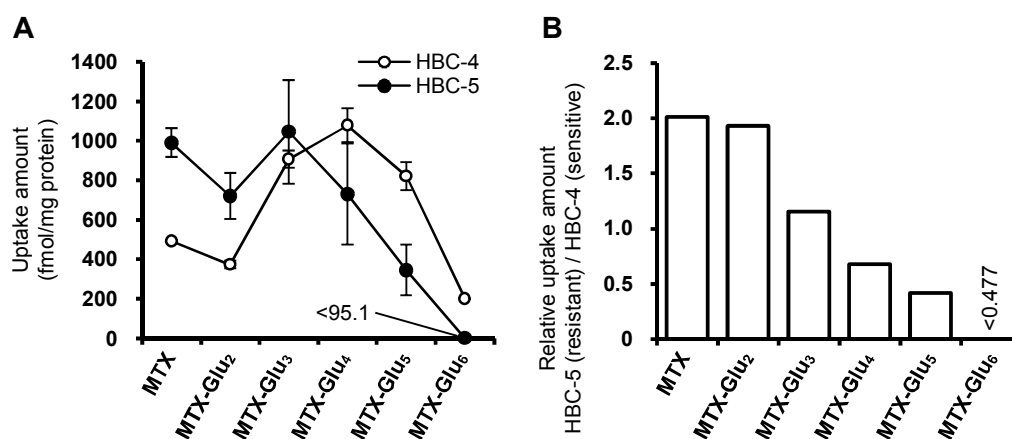


Fig. 2-11 Intracellular accumulation of methotrexate polyglutamates in methotrexate resistant and sensitive human breast cancer cell lines

Two human breast cancer cell lines (HBC-4 and HBC-5) were incubated at 37°C for 24 hours in uptake medium containing 200 nM methotrexate. Intracellular amounts of methotrexate and its polyglutamates (MTX-Glu₂~MTX-Glu₆) were measured by LC-MS/MS. (A) Intracellular amounts of each MTX polyglutamate in HBC-4 and HBC-5 cell lines. Each dot and bar represent the mean ± S.E.M. (HBC-4: n=2, HBC-5: n=3). (B) Relative intracellular amount of each MTX polyglutamate in MTX-resistant HBC-5 cell line as compared to MTX-sensitive HBC-4 cell line.

第3節 考察

胃癌および乳癌細胞株におけるトランスポータータンパク質発現について

本章における研究では薬剤感受性の変動に関与する主なトランスポーターを同定するために、まず胃癌および乳癌細胞株から調製した *crude membrane fraction* における複数トランスポータータンパク質の絶対発現量を明らかにした。発現解析を行った 90 種類の膜タンパクの中で、11 種類の癌細胞株(6 種類の胃癌細胞株および 5 種類の乳癌細胞株)全てで発現が認められたのは GULT1 および 4F2hc のみであり、葉酸取り込みトランスポーターである RFC1 は 9 種類の細胞株において発現が認められた。このように、各癌細胞株において発現しているトランスポータータンパク質およびその絶対発現量には大きな差が存在することが示唆された。さらに、ENT1 は 5 種類の乳癌細胞株全てで発現が認められたが胃癌細胞株では MKN45 のみ発現が認められた。一方で、MCT1 は乳癌細胞株では発現が認められなかったが 6 種類の胃癌細胞株のうち 3 種類の細胞株で発現が認められた(**Table 2-1, 2-2**)。この結果は、トランスポータータンパク質の中には癌の種類によって発現傾向が異なるものが存在することを示唆している。実際これまでに、乳癌細胞株における ENT1 の mRNA 発現量は胃癌細胞株と比較して高発現していることが報告されている(Lu *et al.*, 2002, Kameyama *et al.*, 2011)。また、免疫染色法を用いた研究で、胃癌組織において MCT1 は乳癌組織と比較して高頻度に発現が認められることが報告されている(Pinheiro *et al.*, 2010)。従って、これらのトランスポータータンパク質の発現傾向は本研究の結果と一致していることが認められた。

MDR1 は様々な抗癌剤を細胞外へと排出することで多剤耐性に関与することが報告されており、癌細胞における薬剤耐性を考えるうえで重要かつ有名な ABC トランスポーターである(Szakacs *et al.*, 2006)。しかし、本研究結果から

MDR1 は全ての細胞株で発現が認められず、一方でその他の ABC トランスポーターである MRP1, MRP5, BCRP の発現は認められた(**Table 2-1, 2-2**)。過去の報告では、doxorubicin に持続的に暴露させ元の細胞と比較して 16.6 倍以上 doxorubicin 耐性化した HepG2 細胞株では MDR1 の高発現が認められるなど、抗癌剤に対する獲得耐性細胞株で MDR1 の高発現が認められる報告が多数存在する(Li *et al.*, 2004)。また、肺転移肉腫の患者に対し doxorubicin 投与を行った後に MDR1 の mRNA 発現が増加することも報告されている(Abolhoda *et al.*, 1999)。これらの過去の報告に基づく MDR1 は主に抗癌剤に対する獲得耐性に関与していると考えられる。従って、獲得耐性に対して MDR1 は重要な役割を担うが、今回解析を行った細胞株は獲得耐性細胞株ではないため、薬剤感受性の細胞株間差には MDR1 以外の分子が重要な役割を担っている可能性がある。

胃癌細胞株におけるトランスポーター発現量と抗癌剤感受性との関係について

Fig. 2-1 に示す通り、MRP1 が発現している胃癌細胞株 3 種類(St-4, MKN45, MKN1)において MRP1 発現量は 5 種類の抗癌剤(etoposide, vincristine, epirubicin, vinblastine, doxorubicin)と負の相関性を示した。これら 5 種類の抗癌剤は全て MRP1 の基質となることがこれまでに報告されている(Loscher and Potschka, 2005, Szakacs *et al.*, 2006)。従って、今回解析を行った胃癌細胞株においてこれらの抗癌剤は MRP1 によって細胞外へと排出されていると考えられる。実際に、MRP1 を介した etoposide 輸送を MK571 で阻害した結果、胃癌細胞株における etoposide の細胞内蓄積量が増加した(**Fig. 2-3A**)。MK571 は MRP1 の他に MRP4 および MRP5 を介した輸送の阻害もすることが報告されているが、本研究の結果から胃癌細胞株 3 種類(St-4, MKN45, MKN1)ではこれらのトランスポーターの中では MRP1 のみ発現が認められている(**Table 2-1**)。従って、etoposide 細胞内蓄積量測定を行った細胞株に対して、MK571 は主に MRP1 を介する輸送を阻害していた

ことが示唆された。また、MRP1 による etoposide 排出クリアランスを反映する値である $1/(C/Mss \text{ ratio}) - 1/(C/Mss \text{ ratio}_{MK571})$ が MRP1 発現量と正の相関を示すことが認められた(**Fig. 2-3B**)。従って、これらの胃癌細胞株では MRP1 の絶対発現量が etoposide 排出クリアランスを制御しており、MRP1 発現量が高い細胞株ほど etoposide の細胞外排出の影響を受けやすく etoposide 感受性が低下すると考えられる。過去の報告において、MRP1 を強制発現させた HEK293 細胞株では etoposide 感受性が親細胞と比較して低下し、一方で、tacrolimus 処理によって MRP1 発現量を低下させた T98G 神経膠芽腫細胞では etoposide に対する感受性が増加することが認められている(Nunoya *et al.*, 2003, Garrido *et al.*, 2011)。これらの報告は etoposide 感受性に対する MRP1 の関与を示唆しているが細胞内の etoposide 蓄積量は解析していない。本研究の結果から、胃癌細胞株では MRP1 発現によって etoposide の細胞内蓄積量が低下した結果 etoposide 感受性が低下したことが示唆されたため、実際に MRP1 阻害剤を処理することで感受性が増加するかを解析した。**Table 2-4** に示す通り、MRP1 が発現している胃癌細胞株に対し MRP1 阻害剤である MK571 を etoposide と併用することで etoposide 感受性が増加した。従って、胃癌細胞株における etoposide の感受性低下には MRP1 発現による etoposide の細胞内蓄積量の低下が関与しており、MRP1 阻害剤を etoposide に併用することで etoposide の感受性を回復させることができると示唆された。

膜タンパク質絶対発現量と抗癌剤感受性との比較解析の結果から、ある細胞株群における抗癌剤の薬剤感受性機構に関与するトランスポーターはその他の細胞株群においては関与が認められないことを示唆している。その例として、前述した通り MRP1 の発現が認められる 3 種類の胃癌細胞株(St-4, MKN45, MKN1)においては etoposide 感受性に MRP1 発現が関与するという共通の etoposide 感受性機構を有していると考えられる(**Fig. 2-1A**)。しかし、その他の胃

癌細胞株(MKN28, MKN7, MKN74)においてはMRP1 発現量と etoposide 感受性との間に相関性は認められず(**Fig. 2-1A**)、これらの細胞株における etoposide 感受性には MRP1 以外の因子が関与している可能性がある。これらの細胞株では MRP1 が発現している 3 種類の胃癌細胞株(St-4, MKN45, MKN1)と比較して GLUT1 が高発現しており、さらに etoposide に対する感受性も低い(**Fig. 2-1A**)。GLUT1 の高発現が認められる胃癌患者では GLUT1 低発現患者と比較して全生存期間が短いことが報告されていることから(Kawamura *et al.*, 2001)、GLUT1 高発現による胃癌細胞株悪性度の増加が etoposide 感受性の低下に関与している可能性がある。

乳癌細胞株におけるトランスポーター発現量と抗癌剤感受性との関係について

Fig. 2-5C に示した乳癌細胞株における RFC1 発現量と methotrexate (MTX)感受性の例では、4 種類の乳癌細胞株(MCF-7, HBC-4, BSY-1, MDA-MB-231)で高い正の相関性が認められたことからこれらの細胞株では RFC1 が関与する共通の MTX 感受性機構を有すると考えられる。RFC1 はアニオン交換輸送を駆動力とする葉酸取り込みトランスポーターであり、葉酸類似体の抗癌剤である MTX を基質とすることが報告されている(Moscow *et al.*, 1997, Sharif *et al.*, 1998)。本研究は、複数細胞株における RFC1 絶対発現量と MTX 感受性および定常状態での [³H]MTX 細胞内蓄積量との間の相関性を示した初めての研究である(**Fig. 2-5C, 2-7**)。本研究の結果から、乳癌細胞株において RFC1 発現量が増加することで RFC1 を介した MTX の細胞内取り込みが増加し、その結果として MTX 感受性が増加していることが示唆された。

一方で、**Fig. 2-5C** に示す通り HBC-5 細胞株のみ相関性を示さず、RFC1 が高発現しているが MTX に対する感受性が低いことが認められた。この結果から、HBC-5 細胞株においてはその他の乳癌細胞株(MCF-7, HBC-4, BSY-1,

MDA-MB-231)とは異なり RFC1 以外の機構が MTX 感受性に主に関与していることが示唆された。膜タンパク質発現解析の結果、解析を行った全 11 種類の癌細胞株の中でも HBC-5 細胞株のみにおいて BCRP の発現が認められた(**Table 2-1, 2-2**)。BCRP は ABCG ファミリーに属する ABC トランスポーターであり ATP を駆動力として MTX を細胞外へと排出することが報告されている(Chen *et al.*, 2003, Volk and Schneider, 2003)。従って、HBC-5 細胞株では RFC1 によって一度細胞内へと取り込まれた MTX が BCRP の高発現によって再び細胞外へと排出された結果、MTX 感受性が低下したと考えられた。しかし、**Fig. 2-7A** に示した [³H]MTX 細胞内蓄積量測定の結果、RFC1 発現量が同程度である HBC-4 細胞株と比較しても HBC-5 細胞株における [³H]MTX 細胞内蓄積量は高いことが認められ、BCRP の [³H]MTX 細胞外排出への関与は低いことが示唆された。なお、HBC-4 細胞株は HBC-5 細胞株と比較して 1290 倍感受性が高いことから、トランスポータータンパク質を介した MTX の細胞内外への輸送過程では HBC-4 細胞株および HBC-5 細胞株間の MTX 感受性は説明ができないことが示唆された。

第 2 節 結果 2-2-6.でも述べた通り、MTX は細胞内でポリグルタミル化を受けることで MTX 細胞内蓄積時間が延長することが報告されており、さらに MTX ポリグルタミル化体蓄積量の減少が MTX 感受性の低下に関与することも報告されている(Waltham *et al.*, 1997, Cole *et al.*, 2001, Assaraf, 2007)。また、MTX の標的酵素である DHFR の過剰発現も MTX 感受性の低下に関与することが報告されている(Gorlick *et al.*, 1996)。HBC-5 細胞株(MTX 耐性)では MTX のポリグルタミル化を行う酵素である FPGS の発現量が HBC-4 細胞株(MTX 感受性)のわずか 42.1%であった一方で、脱グルタミル化を行う酵素である GGH および MTX の標的分子である DHFR の発現量は両細胞株でほとんど差は認められなかった(**Table 2-5**)。さらに、グルタミン酸残基がより多く結合した MTX ポリグルタミル化体(MTX-Glu₄, -Glu₅, -Glu₆)の HBC-5 細胞株における細胞内蓄積量は HBC-4

細胞株と比較して低いという結果であった(**Fig. 2-11**)。これらの結果を踏まえると、HBC-5 細胞株における FPGS 発現量低下に伴う MTX ポリグルタミル化反応の低下が MTX 感受性の低下に関与していると考えられる。しかし、今回検出された MTX ポリグルタミル化体の中でも最もグルタミン酸が結合した MTX-Glu₆ においても両細胞株間の蓄積量差は少なくとも 2.09 倍である(HBC-4: 199 fmol/mg protein vs HBC-5: U.L.Q. < 95.1 fmol/mg protein)にも関わらず(**Fig. 2-11A**)、両細胞株間では 1.290 倍もの MTX 感受性差が認められている。従って、FPGS の発現量はこれら細胞株間での MTX 感受性を一部説明しているに過ぎない。各 MTX ポリグルタミル化体の DHFR (MTX の標的酵素)に対する阻害活性は未だ明らかになっておらず、今後阻害活性を明らかにすることが MTX 感受性の細胞株差(個人差)を解明する一つの方法であると考えられる。また、22 番目の leucine が arginine に変異した DHFR は MTX への親和性が低下して MTX 感受性の低下に関与することが報告されていることから(Lewis *et al.*, 1995)、DHFR の変異に関しても考慮する必要があると考えられる。

以上、第 2 章の結論として、胃癌細胞株においては etoposide 感受性変動に MRP1 発現量が、乳癌細胞株においては MTX 感受性変動に RFC1 および FPGS がそれぞれ関与していることが示唆された。また、詳細なメカニズムに関しては未だ不明ではあるが GLUT1 や 4F2hc の発現量に関しても薬剤感受性の変動に関与する可能性があることが今回の解析から分かった。このように、定量的標的プロテオミクスを用いることで、オミクスや個別解析の結果蓄積されてきた薬剤感受性候補分子の中から実際に薬剤感受性の変動に主な関与を示す分子を同定することが可能であることが示唆された。

第3章 悪性脳腫瘍組織検体における膜タンパク質発現プロファイルの解明

第1節 序論

悪性脳腫瘍は、脳組織自体から発生する原発性脳腫瘍、他の臓器の癌が脳へ転移した転移性脳腫瘍の大きく2種類に分類される。さらに、原発性脳腫瘍は細胞の形や性質により細かく分類されており、グリア細胞から発生する glioma が原発性脳腫瘍全体の約44%を占め最も発症率が高い(Raizer, 2005)。Glioma はさらに組織学的特徴を基にした悪性度によって grade I~IV の4グループに分類され、grade I の腫瘍が最も悪性度が低く、grade IV が最も悪性度が高い(Louis *et al.*, 2007)。この中でも、神経膠芽腫(glioblastoma multiforme: GBM)と呼ばれる種類の glioma は高浸潤性や高い治療抵抗性を有しており、WHO による脳腫瘍分類において最も悪性度の高い grade IV に属している。原発性脳腫瘍が他臓器に転移する頻度は低いですが、逆に、他臓器で生じた癌が脳に転移することが多く、これは転移性脳腫瘍と呼ばれる。特に肺癌からの転移が高く、次いで乳癌からの転移が多いことが分かっている(Gerstner and Fine, 2007)。悪性脳腫瘍は治療困難な腫瘍の一つであり、glioma 全体の5年生存率は38%、最も悪性度の高い GBM は6%と極めて予後不良である(国立がんセンターホームページより)。また、転移性脳腫瘍についても5年生存率が13%と予後不良である。そのため、悪性脳腫瘍の予後改善は大きな課題となっている。

第1章で述べた通り、悪性脳腫瘍のような固形腫瘍の場合は外科的手術によって腫瘍部位の完全摘出を行うことが最適な治療法といえる。しかし、脳腫瘍は浸潤性が高く正常部位との境界が不明瞭であるため、完全摘出を行うことが非常に困難である。さらに、脳は生命維持や運動および思考を司る中枢として重要な機能を有する部位が存在することから、その部位に腫瘍が形成された場合には腫瘍の一部を温存せざるを得ない。従って、悪性脳腫瘍治療では、残存

した腫瘍に対する適切な化学療法や放射線療法を行うことが重要である。外科的手術の補助療法として行われる化学療法の重要性は高いが、現在用いられている標準的な補助療法に対し耐性を示す患者も存在するため、手術で温存した腫瘍に対しその特性に応じた適切な治療を行うことが求められている。また、悪性脳腫瘍では腫瘍の特性によって発現している標的分子の種類が異なっていることが報告されている(Kleihues and Ohgaki, 1999)。以上のように、患者によって腫瘍の特性が異なっているため脳腫瘍に対する分子標的治療も含めた個別化治療の重要性は高く、この個別化治療を確立するためには治療感受性や悪性度の指標となる分子の同定が必須であると考えられる。

トランスポーターは薬剤の取り込みや排出、そして栄養の供給に関与し、増殖因子受容体は腫瘍の成長などに関与しているなど、これらの分子は腫瘍にとって重要な役割を果たしている。さらに、増殖因子受容体の多くは分子標的薬の標的となっており、化学療法における重要な分子となっている。しかし、これまでに悪性脳腫瘍組織におけるトランスポーターおよび増殖因子受容体タンパク質絶対発現量の網羅的な解析例は報告されていない。また、分子標的薬の標的分子の発現は通常個別の分子ごとに発現解析を行っているが、これまでに述べた通り標的分子は多数存在するため、同時に発現解析を行うことでより迅速な標的療法の選択につながると考えられる。

従って、本章では定量的標的プロテオミクスを用いて悪性脳腫瘍組織検体におけるトランスポーターおよび増殖因子受容体タンパク質などの発現解析を行い、どの膜タンパク質がどの程度発現しているか、そしてどの程度発現に個人差が認められるかを明らかにすることとした。さらに、その中から個別化分子標的治療のターゲット候補となり得る分子を同定することとした。なお、本研究は東北大学大学院薬学研究科および金沢大学大学院医学系研究科の倫理委員会の承認のもと行った。

第2節 結果

3-2-1. 悪性脳腫瘍組織からの細胞膜画分調製

本研究では悪性脳腫瘍組織における膜タンパク質の発現プロファイルを明らかにするために、83 症例の悪性脳腫瘍組織(GBM 58 症例(うち再発 GBM 8 症例含む)、転移性脳腫瘍 9 症例、その他の悪性脳腫瘍 16 症例)を解析対象として研究を行った(**Table 3-1**)。また、悪性脳腫瘍に加え、良性脳腫瘍(検体 ID: PA)、悪性リンパ腫(検体 ID: ML)、および悪性脳腫瘍組織の対照組織としての非腫瘍脳組織 12 症例についても解析対象とした(**Table 3-1**)。なお、脳腫瘍検体および非腫瘍脳組織については金沢大学大学院医学系研究科 脳・脊髄機能制御学 濱田潤一郎 教授および中田光俊 講師から提供を受けた。また、非腫瘍脳組織のうち ABS111174161, ABS352JK00909, ABS2467970101 の 3 検体については Analytical Biological Services Inc. (Wilmington, DE, USA)から購入した。定量的標的プロテオミクスの手法を用いた複数膜タンパク質の絶対発現量解析を行うに先立ち、これら脳腫瘍組織および非腫瘍脳組織から plasma membrane fraction を調製した。ホモジナイズ法によって組織破碎を行った後にスクロース密度勾配遠心法(第 8 章 実験方法参照)を用いて湿重量 86.6-1240 mg (平均 501 mg)の組織検体から 38.6-1760 μg protein (平均 289 μg protein)の plasma membrane fraction を得た(**Fig. 3-1**)。

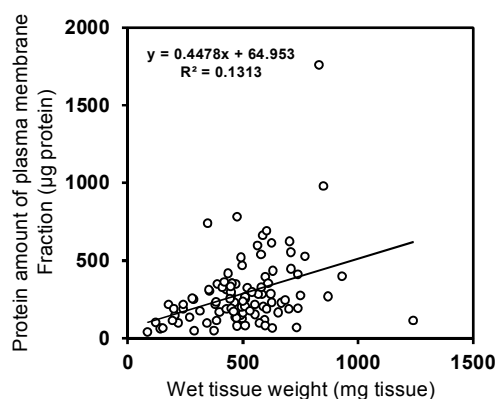


Fig. 3-1 Comparison of starting tissue weight and obtained amount of plasma membrane fraction from each tissue

Table 3-1 Patient information analyzed in this study

Patient ID	Age	Sex	Histological diagnosis (WHO grade)	Survival time (months)	PFS (months)	Therapy
<i><u>Glioblastoma multiforme</u></i>						
GBM031997	39	F	Glioblastoma (IV)	6.6	Unknown	RTx, CTx(ACNU, MCNU)
GBM040909	34	M	Radiation-induced glioblastoma (IV)	17.9	14.4	RTx, CTx(TMZ)
GBM2	78	M	Glioblastoma (IV)	24.8	5.0	Unknown
GBM4	8	M	Glioblastoma (IV)	9.0	5.0	RTx, CTx(ACNU, MCNU, VCR)
GBM21	52	M	Glioblastoma (IV)	12.3	7.6	RTx, CTx(ACNU)
GBM35	32	M	Glioblastoma (IV)	12.0	7.0	RTx, CTx(IAR)
GBM45	57	F	Glioblastoma (IV)	21.1	13.9	RTx, CTx(TMZ)
GBM50	64	F	Glioblastoma (IV)	23.1	7.1	RTx, CTx(TMZ)
GBM52	64	M	Glioblastoma (IV)	18.2	11.0	RTx, CTx(TMZ)
GBM53	68	M	Glioblastoma (IV)	62.4	5.0	RTx, CTx(TMZ)
GBM55	64	M	Glioblastoma (IV)	18.5	10.2	RTx, CTx(TMZ)
GBM61	65	M	Glioblastoma (IV)	41.9	Unknown	RTx, CTx(TMZ)
GBM70	59	F	Glioblastoma (IV)	25.7	10.0	RTx, CTx(TMZ)
GBM71	55	M	Glioblastoma (IV)	15.4	9.2	RTx, CTx(TMZ)
GBM86	86	M	Glioblastoma (IV)	11.6	3.7	RTx, CTx(TMZ)
GBM87	53	M	Glioblastoma (IV)	12.8	9.0	RTx, CTx(TMZ)
GBM88	59	F	Glioblastoma (IV)	38.7	38.7	RTx, CTx(TMZ)
GBM89	76	M	Glioblastoma (IV)	16.1	4.4	RTx, CTx(TMZ)
GBM90	78	F	Glioblastoma (IV)	8.8	6.1	RTx, CTx(TMZ)
GBM91	71	M	Glioblastoma (IV)	38.2	No recurrence	RTx, CTx(TMZ)
GBM98	65	M	Glioblastoma (IV)	10.2	7.0	RTx, CTx(TMZ)
GBM99	61	F	Glioblastoma (IV)	16.4	6.7	RTx, CTx(TMZ)
GBM100	61	M	Glioblastoma (IV)	13.7	12.8	RTx, CTx(TMZ)
GBM105	55	M	Glioblastoma (IV)	19.3	13.9	RTx, CTx(TMZ)
GBM106/Autopsy	58	M	Glioblastoma (IV)	0.6		RTx, CTx(TMZ)
GBM107	43	M	Glioblastoma (IV)	18.9	No recurrence	RTx, CTx(TMZ)
GBM108	79	F	Glioblastoma (IV)	11.3	8.5	RTx, CTx(TMZ)
GBM109	83	M	Glioblastoma (IV)	11.0	8.0	RTx, CTx(TMZ)
GBM113	68	F	Glioblastoma (IV)	14.6	6.8	Neoadjuvant RTx, CTx(TMZ)
GBM114	71	M	Glioblastoma (IV)	14.0	9.6	RTx, CTx(TMZ)
GBM115	64	M	Glioblastoma (IV)	12.8	No recurrence	RTx, CTx(TMZ)
GBM116	70	M	Glioblastoma (IV)	8.0	3.4	RTx, CTx(TMZ)
GBM117	80	F	Glioblastoma (IV)	11.8	No recurrence	RTx, CTx(TMZ)
GBM118	74	M	Glioblastoma (IV)	11.3	8.6	RTx, CTx(TMZ)
GBM119	54	M	Glioblastoma (IV)	11.2	No recurrence	RTx, CTx(TMZ)
GBM123	62	M	Glioblastoma (IV)	9.1	No recurrence	RTx, CTx(TMZ)
GBM124	61	M	Glioblastoma (IV)	9.0	8.4	RTx, CTx(TMZ)
GBM125	60	M	Glioblastoma (IV)	7.8	No recurrence	RTx, CTx(TMZ)
GBM126	15	F	Secondary glioblastoma (IV)	8.2	No recurrence	RTx, CTx(TMZ)
GBM127	77	F	Secondary glioblastoma (IV)	6.9	Unknown	RTx, CTx(TMZ)
GBM130	63	M	Glioblastoma (IV)	5.4	No recurrence	RTx, CTx(TMZ)
GBM131	44	M	Secondary glioblastoma (IV)	4.9	No recurrence	RTx, CTx(TMZ)
GBM132	42	F	Secondary glioblastoma (IV)	4.9	No recurrence	RTx, CTx(TMZ)
GBM133	76	M	Glioblastoma (IV)	4.8	No recurrence	RTx, CTx(TMZ)
GBM134	39	M	Glioblastoma (IV)	4.6	No recurrence	RTx, CTx(TMZ)
GBM135	72	M	Glioblastoma (IV)	4.1	No recurrence	RTx, CTx(TMZ)
GBM136	68	M	Glioblastoma (IV)	3.2	No recurrence	RTx, CTx(TMZ)
GBM137	76	F	Glioblastoma (IV)			
GBM138	73	F	Glioblastoma (IV)			
Autopsy	77	M	Glioblastoma (IV)	24.4	7.3	RTx, CTx(TMZ)

The above patient information is as of September 24, 2013. ACNU: nimustine, CBDCA: carboplatin, CDDP: cisplatin, CPM: cyclophosphamide, CPT-12: camptothecin, CTx: chemotherapy, GEM: gemcitabine, IAR: interferon- β +nimustine, MCNU: ranimustine, MTX: methotrexate, PAV: procarbazine+nimustine+vincristine, PFS: progression-free survival, RTx: radiation therapy, TMZ: temozolomide, VCR: vincristine

Table 3-1 Patient information analyzed in this study (Continued)

Patient ID	Age	Sex	Histological diagnosis (WHO grade)	Survival time (months)	PFS (months)	Therapy
<u>Recurrent glioma</u>						
Rec24	68	M	Glioblastoma (IV) / <i>Recurrence of GBM53</i>	57.3	No recurrence	RTx, CTx (TMZ)
Rec29	58	F	Glioblastoma (IV) / <i>Recurrence of GBM45</i>	21.1	13.9	RTx, CTx (TMZ)
Rec44	39	M	Secondary glioblastoma (IV)	37.5	4.3	RTx, CTx (TMZ)
Rec45	35	M	Glioblastoma (IV) / <i>Recurrence of GBM040909</i>	17.9	14.4	CTx (Sunitinib) after recurrence
Rec48	60	F	Glioblastoma (IV) / <i>Recurrence of GBM70</i>	25.7	10.0	CTx (TMZ)
Rec49	39	M	Glioblastoma (IV) / <i>Recurrence of Rec44</i>	33.3	23.9	RTx, CTx (TMZ)
Rec51	77	M	Glioblastoma (IV) / <i>Recurrence of GBM89</i>	16.1	4.4	CTx (TMZ)
Rec53/MRI+	47	M	Oligodendroglioma (II) MRI positive / <i>Malignant change</i>	18.6	6.8	CTx (TMZ)
Rec53/MRI-	47	M	Oligodendroglioma (II) MRI negative / <i>Malignant change</i>	18.6	6.8	CTx (TMZ)
Rec56	55	M	Glioma (II or III)	13.3	No recurrence	CTx (TMZ)
Rec58	35	M	Anaplastic astrocytoma (III) / <i>Recurrence of AA15</i>	7.1	6.0	CTx (TMZ)
Rec59	57	M	Glioblastoma (IV) / <i>Recurrence of GBM105</i>	5.3	No recurrence	CTx (TMZ)
<u>Metastatic brain tumor</u>						
Meta5	74	F	Metastatic brain tumor from lung cancer	Unknown	Unknown	
Meta7	49	M	Metastatic brain tumor from lung cancer	10.8	23.5	
Meta8	61	F	Metastatic brain tumor from lung cancer	8.4	Unknown	
Meta12	76	F	Metastatic brain tumor from lung cancer	34.2	11.6	
Meta13	58	M	Metastatic brain tumor from lung cancer	16.2	10.3	RTx, CTx (CDDP+GEM)
Meta14	76	M	Metastatic brain tumor from lung cancer	13.8	1.5	RTx, CTx (CBDCA+CPT-12)
Meta16	32	M	Metastatic brain tumor from lacrimal gland cancer	10.1	1.6	RTx
Meta17	66	M	Metastatic brain tumor from lung cancer	13.5	No recurrence	RTx
Meta29	53	F	Metastatic brain tumor from breast cancer	8.8	No recurrence	RTx
<u>Other brain tumor</u>						
AM2	62	F	Anaplastic meningioma (III)	7.0	1.0	RTx, CTx (Sunitinib)
AM4	37	F	Atypical meningioma (II)	28.0	8.7	RTx, CTx (Sunitinib)
STC1	60	M	Sinonasal teratocarcinoma (N/D)	33.0	No recurrence	RTx
DA27	52	M	Astrocytoma (II)	29.1	No recurrence	-
DA28	34	M	Diffuse astrocytoma (II)	25.6	24.1	CTx (TMZ)
DA34	37	M	Diffuse astrocytoma (II)	3.9	No recurrence	-
AOA2	42	M	Anaplastic oligoastrocytoma (III)	25.6	No recurrence	CTx (PAV)
AA15	33	M	Anaplastic astrocytoma (III)	32.4	15.7	CTx (TMZ)
AA16	28	F	Anaplastic astrocytoma (III)	13.7	No recurrence	CTx (TMZ)
PNET1	9	F	Primitive neuroectodermal tumor (IV)	26.1	No recurrence	RTx, CTx (CDDP, VCR, CPM)
PA	17	M	Pituitary adenoma (Benign tumor)	23.2	No recurrence	-
PA3	12	M	Pilocytic astrocytoma (II)	11.3	No recurrence	-
PXA20121023	23	F	Pleomorphic xanthoastrocytoma (III or IV)	3.2	3.1	RTx, CTx (TMZ)
ML	66	M	Malignant lymphoma (N/D)	19.0	No recurrence	CTx (MTX)
<u>Normal brain</u>						
ABS111174161	16	M	Normal brain cortex	-	-	-
ABS352JK00909	56	F	Normal brain cortex	-	-	-
ABS2467970101	70	M	Normal brain cortex	-	-	-
NB40	52	M	Astrocytoma / <i>Normal region of DA27</i>	-	-	-
NB41	56	M	SAH due to A-com rupture / <i>Normal region</i>	-	-	-
NB43	9	F	Primitive neuroectodermal tumor / <i>Normal region of PNET1</i>	-	-	-
NB44	11	F	Capillary hemangioma / <i>Normal region</i>	-	-	-
GBM99/Normal	61	F	Glioblastoma / <i>Normal region of GBM99</i>	-	-	-
GBM115/Normal	64	M	Glioblastoma / <i>Normal region of GBM115</i>	-	-	-
GBM125/Normal	60	M	Glioblastoma / <i>Normal region of GBM125</i>	-	-	-
GBM137/Normal	76	F	Glioblastoma / <i>Normal region of GBM137</i>	-	-	-
GBM138/Normal	73	F	Glioblastoma / <i>Normal region of GBM138</i>	-	-	-

The above patient information is as of September 24, 2013. ACNU: nimustine, CBDCA: carboplatin, CDDP: cisplatin, CPM: cyclophosphamide, CPT-12: camptothecin, CTx: chemotherapy, GEM: gemcitabine, IAR: interferon- β +nimustine, MCNU: ranimustine, MTX: methotrexate, PAV: procarbazine+nimustine+vincristine, PFS: progression-free survival, RTx: radiation therapy, TMZ: temozolomide, VCR: vincristine

3-2-2. 悪性脳腫瘍組織における複数膜タンパク質絶対発現量

本章の研究では分子標的薬を含む抗癌剤の薬効の個人差に関与する可能性のある 33 種類の膜タンパク質を発現解析の対象分子とした。なお、33 種類の膜タンパク質には、13 種類の分子標的薬標的分子あるいはその候補分子、4 種類の APC トランスポーター、10 種類の SLC トランスポーター、5 種類のその他の分子(Claudin5, JAM-A, β -catenin, PECAM1, γ -gtp)、細胞膜マーカー分子(Na^+/K^+ ATPase)が含まれる。各組織検体から調製した plasma membrane fraction を用いてこれら膜タンパク質の発現解析を行った結果、VEGFR2 を除く 32 種類の膜タンパク質についてはいずれかの検体で発現が認められた(**Table 3-2**)。なお、**Table 3-2** で*を付けた定量値は各測定で設定した 4 つの SRM/MRM transition のうち 2 つの SRM/MRM transition でピークが検出されたものであり、信頼性に劣る定量値として記載している。また、N.D. (not detected)は安定同位元素標識内標準ペプチドおよび組織由来の標的ペプチドともにピークが検出されなかったことを示し、N.Q. (not quantified)は該当分子の解析を行っていないことを示している。細胞膜マーカータンパク質である Na^+/K^+ ATPase に関しては、 Na^+/K^+ ATPase の安定同位元素標識内標準ペプチドのピークが検出されなかった 2 検体(GBM45, Rec29)を除いた全ての検体で発現が認められた(**Table 3-2**)。

Table 3-2 に示した各組織検体における発現解析の結果に基づいて、GBM 検体間および全ての脳腫瘍組織間それぞれにおける発現量平均値±標準偏差(S.D.)、発現量中央値、最大発現量および最小発現量をまとめたものを **Table 3-3** に示す。なお、定量限界以下(U.L.Q.)であった検体に関しては発現量を 0 として計算に含めている。分子標的薬標的分子の中でも EGFR は最も高頻度に発現が認められ、GBM 組織検体の 85.7% (56 検体中 48 検体)、そして全ての脳腫瘍組織検体の 70.7% (83 検体中 70 検体)において発現が認められた。また、次に高頻度で認められた分子としては CD37 が挙げられ、GBM 組織検体の 72.7% (55 検体中 40 検

体)、全ての脳腫瘍組織検体の 70.7% (82 検体中 58 検体)において発現が認められた。トランスポータータンパク質の中では GLUT1, GLUT3/14, 4F2hc の発現が全ての GBM 検体で認められた。なお、GLUT3/14 に関しては GLUT3 および GLUT14 をともに認識するペプチド断片を用いて解析した定量値であり、GLUT3/14 の定量値は GLUT3 および GLUT14 の発現量の和となっている。また、様々な抗癌剤を細胞外へと排出する ABC トランスポーター(MDR1, MRP1, MRP4, BCRP)に関しては GBM 組織検体の 60.3% (MDR1) - 94.8% (MRP4)で発現が認められ、分子標的薬標的分子と比較すると高頻度に発現が認められる傾向であった。一方で、SLC トランスポーターに関しては GBM 組織検体における発現頻度は 15.5% (PCFT) - 100% (GLUT1, GLUT3/14, 4F2hc)であり、各トランスポーターによって大きな差があることが認められた。また、その他の分子に関しては β -catenin は全ての GBM 組織検体において発現が認められ、JAM-A は 97.3% (37 検体中 36 検体)とほぼ全ての GBM 組織検体で発現が認められた。

前述した通り EGFR の発現は 85.7%の GBM 組織検体において認められたが、EGFR の発現が認められた検体に限っても検体間で 496 倍もの EGFR 発現量差が認められた(GBM52: 143 fmol/ μ g protein vs Rec24: 0.288 fmol/ μ g protein) (**Table 3-2**)。GBM 組織検体を EGFR の平均発現量(18.6 fmol/ μ g protein)で EGFR 高発現群および低発現群に分類した際、PDGFR α の発現は主に EGFR 低発現群に認められた(**Fig. 3-2A, B**)。さらに、c-kit の発現は PDGFR α 発現が認められる GBM 組織検体において主に認められた(**Fig. 3-2B, C**)。一方で、VEGFR1 の発現は主に EGFR 高発現群で認められた(**Fig. 3-2A, D**)。ERBB2 に関しては PDGFR α , c-kit, VEGFR1 と共発現している傾向は認められず、EGFR 高発現群および低発現群における発現傾向に大きな差は認められなかった(**Fig. 3-2E**)。

Table 3-2 Quantitative values of proteins in plasma membrane fraction of brain tumor and non-tumor brain tissues

	Quantitative value (fmol/μg protein of plasma membrane fraction)								
	GBM031997	GBM040909	GBM2	GBM4	GBM21	GBM35	GBM45	GBM50	GBM52
<u>Target molecules for molecular-targeted drugs</u>									
PDGFR α	U.L.Q. (<0.0570)	16.5 \pm 0.6	11.3 \pm 0.8	U.L.Q. (<0.0782)	1.48 \pm 0.06	U.L.Q. (<0.399)	U.L.Q. (<0.361)	U.L.Q. (<0.0597)	U.L.Q. (<0.137)
PDGFR β	U.L.Q. (<0.182)	U.L.Q. (<0.523)	U.L.Q. (<0.0976)	U.L.Q. (<0.183)	U.L.Q. (<0.576)	N.Q.	N.Q.	U.L.Q. (<0.211)	U.L.Q. (<0.475)
EGFR	1.95 \pm 0.15	0.789 \pm 0.023	6.56 \pm 0.16	1.53 \pm 0.11	0.772 \pm 0.059	3.35 \pm 0.43	N.Q.	24.1 \pm 1.0	143 \pm 7
ERBB2	2.43 \pm 0.12	U.L.Q. (<0.0304)	U.L.Q. (<0.195)	U.L.Q. (<0.240)	U.L.Q. (<0.0433)	U.L.Q. (<0.172)	0.421 \pm 0.090	U.L.Q. (<0.232)	U.L.Q. (<0.0761)
VEGFR1	N.D.	U.L.Q. (<1.98)	U.L.Q. (<0.109)	N.D.	U.L.Q. (<2.06)	N.Q.	N.Q.	U.L.Q. (<0.0806)	U.L.Q. (<2.06)
VEGFR2	U.L.Q. (<0.735)	U.L.Q. (<0.272)	U.L.Q. (<0.112)	U.L.Q. (<0.729)	U.L.Q. (<0.289)	N.Q.	N.Q.	U.L.Q. (<0.0732)	U.L.Q. (<0.283)
VEGFR3	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.Q.	N.Q.	N.D.	N.D.
FLT3	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.Q.	N.Q.	N.D.	N.D.
MET	U.L.Q. (<0.191)	U.L.Q. (<0.176)	U.L.Q. (<0.180)	U.L.Q. (<0.177)	U.L.Q. (<0.201)	N.Q.	N.Q.	U.L.Q. (<0.114)	U.L.Q. (<0.163)
IGFR	U.L.Q. (<0.500)	U.L.Q. (<0.376)	U.L.Q. (<0.125)	U.L.Q. (<0.499)	U.L.Q. (<0.384)	N.Q.	N.Q.	U.L.Q. (<0.0742)	U.L.Q. (<0.350)
CD33	U.L.Q. (<0.106)	U.L.Q. (<0.306)	U.L.Q. (<0.0372)	1.37 \pm 0.06 *	U.L.Q. (<0.0407)	N.Q.	N.Q.	U.L.Q. (<0.0416)	U.L.Q. (<0.0431)
CD37	U.L.Q. (<0.414)	0.269 \pm 0.035 *	U.L.Q. (<0.110)	1.29 \pm 0.21 *	U.L.Q. (<0.158)	N.Q.	N.Q.	0.361 \pm 0.010 *	0.340 \pm 0.024 *
c-kit	U.L.Q. (<0.255)	7.12 \pm 0.60	U.L.Q. (<0.0329)	U.L.Q. (<0.246)	U.L.Q. (<0.692)	N.Q.	N.Q.	U.L.Q. (<0.0412)	U.L.Q. (<0.672)
<u>ABC transporter proteins</u>									
MDR1	U.L.Q. (<0.0436)	1.11 \pm 0.13	0.450 \pm 0.019 *	U.L.Q. (<0.0426)	0.467 \pm 0.099	0.608 \pm 0.083	U.L.Q. (<0.250)	0.631 \pm 0.013 *	0.740 \pm 0.147
MRP1	2.52 \pm 0.22	0.155 \pm 0.045 *	U.L.Q. (<0.0719)	0.627 \pm 0.033 *	0.095 \pm 0.014 *	U.L.Q. (<0.133)	N.Q.	0.703 \pm 0.038 *	0.110 \pm 0.029 *
MRP4	0.495 \pm 0.029	0.465 \pm 0.012	0.975 \pm 0.040	0.550 \pm 0.017	0.419 \pm 0.029	0.485 \pm 0.154	0.471 \pm 0.114	0.612 \pm 0.005	0.669 \pm 0.040
BCRP	0.774 \pm 0.081 *	3.22 \pm 0.14	0.988 \pm 0.042	0.585 \pm 0.056 *	1.41 \pm 0.16	1.18 \pm 0.19	0.594 \pm 0.180	2.23 \pm 0.05	1.58 \pm 0.14
<u>SLC transporter proteins</u>									
ASCT2	2.15 \pm 0.16	0.751 \pm 0.201 *	U.L.Q. (<0.196)	1.81 \pm 0.10	U.L.Q. (<0.384)	U.L.Q. (<0.589)	U.L.Q. (<0.504)	U.L.Q. (<0.115)	U.L.Q. (<0.365)
GLUT1	13.4 \pm 0.2	11.8 \pm 0.3	21.4 \pm 1.3	26.6 \pm 0.9	17.6 \pm 0.1	5.24 \pm 0.65	26.6 \pm 2.4	16.7 \pm 0.9	5.59 \pm 0.19
GLUT3/14	3.40 \pm 0.09	2.13 \pm 0.23	6.94 \pm 0.18	7.22 \pm 0.31	6.30 \pm 0.28	7.77 \pm 0.83	5.92 \pm 0.31	4.38 \pm 0.11	6.09 \pm 0.35
MCT4	U.L.Q. (<0.566)	U.L.Q. (<1.14)	U.L.Q. (<1.19)	6.56 \pm 0.16	3.26 \pm 0.46	U.L.Q. (<0.229)	1.54 \pm 0.08	U.L.Q. (<1.07)	1.15 \pm 0.05 *
PEPT2	2.59 \pm 0.28	0.590 \pm 0.118	1.04 \pm 0.03	U.L.Q. (<0.101)	0.433 \pm 0.136	6.34 \pm 0.47	0.605 \pm 0.036	1.67 \pm 0.19	0.843 \pm 0.084
MCT1	5.71 \pm 0.50	2.02 \pm 0.27	2.03 \pm 0.05	2.18 \pm 0.12	2.42 \pm 0.23	2.58 \pm 0.95 *	U.L.Q. (<0.917)	4.31 \pm 0.38	1.85 \pm 0.19
ENT1	N.D.	N.D.	0.556 \pm 0.058 *	N.D.	N.D.	1.02 \pm 0.15	0.999 \pm 0.125	1.43 \pm 0.01 *	N.D.
4F2hc	3.55 \pm 0.50	4.80 \pm 0.11	3.42 \pm 0.26	4.69 \pm 0.36	4.51 \pm 0.23	2.44 \pm 0.34	0.843 \pm 0.089	4.08 \pm 0.19	5.93 \pm 0.31
PCFT	1.31 \pm 0.11	U.L.Q. (<0.201)	U.L.Q. (<0.146)	1.66 \pm 0.06	U.L.Q. (<0.215)	0.859 \pm 0.263	0.778 \pm 0.239	U.L.Q. (<0.116)	U.L.Q. (<0.195)
FATP1	U.L.Q. (<0.577)	5.39 \pm 0.26	U.L.Q. (<0.312)	U.L.Q. (<0.675)	2.62 \pm 0.20 *	U.L.Q. (<1.20)	U.L.Q. (<1.02)	3.11 \pm 0.36	3.65 \pm 0.44
<u>Other proteins</u>									
Claudin5	2.12 \pm 0.12 *	1.07 \pm 0.16 *	0.729 \pm 0.106 *	U.L.Q. (<0.427)	U.L.Q. (<0.0958)	U.L.Q. (<1.38)	U.L.Q. (<0.812)	1.53 \pm 0.18	0.825 \pm 0.068 *
JAM-A	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.18 \pm 0.09	3.02 \pm 0.54	N.D.	N.D.
β -catenin	13.8 \pm 1.2	4.95 \pm 0.67	4.75 \pm 0.94	1.68 \pm 0.09	4.75 \pm 0.49	7.44 \pm 1.00	2.57 \pm 0.29	14.6 \pm 0.4	6.06 \pm 0.81
PECAM1	2.11 \pm 0.46 *	1.42 \pm 0.25 *	2.19 \pm 0.14 *	5.67 \pm 0.35	U.L.Q. (<0.0656)	N.Q.	N.Q.	U.L.Q. (<0.106)	U.L.Q. (<0.0436)
γ -gtp	U.L.Q. (<0.306)	1.23 \pm 0.23 *	U.L.Q. (<0.324)	U.L.Q. (<0.360)	1.29 \pm 0.33 *	0.778 \pm 0.094	0.569 \pm 0.136	1.61 \pm 0.10 *	0.934 \pm 0.216 *
<u>Membrane marker proteins</u>									
Na ⁺ /K ⁺ ATPase	70.9 \pm 5.0	67.5 \pm 2.4	56.7 \pm 2.8	20.7 \pm 1.0	70.1 \pm 2.9	82.4 \pm 5.8	N.Q.	85.0 \pm 5.9	83.4 \pm 1.7

Each value represents protein expression level in plasma membrane fraction (the mean \pm S.E.M., n=2-4 SRM/MRM transitions). U.L.Q. means “under the limit of quantification” and the value in brackets following U.L.Q. represents the value of the quantification limit (fmol/μg protein). *The reliability of the calculated values is considered to be less than that of other detected molecules, because in these cases only two among four SRM/MRM transitions gave detectable peak areas over 5000 counts. N.Q.; not quantified, N.D.; not detected.

Table 3-2 Quantitative values of proteins in plasma membrane fraction of brain tumor and non-tumor brain tissues (Continued)

Quantitative value (fmol/μg protein of plasma membrane fraction)									
	GBM53	GBM55	GBM61	GBM70	GBM71	GBM86	GBM87	GBM88	GBM89
<u>Target molecules for molecular-targeted drugs</u>									
PDGFR α	U.L.Q. (<0.389)	U.L.Q. (<0.0488)	U.L.Q. (<0.288)	U.L.Q. (<0.0821)	0.471 \pm 0.039	0.520 \pm 0.010 *	U.L.Q. (<0.0771)	0.457 \pm 0.030	U.L.Q. (<0.142)
PDGFR β	U.L.Q. (<0.196)	U.L.Q. (<0.106)	U.L.Q. (<0.301)	U.L.Q. (<0.325)	U.L.Q. (<0.549)	U.L.Q. (<0.491)	0.957 \pm 0.137 *	2.66 \pm 0.34	U.L.Q. (<0.563)
EGFR	0.703 \pm 0.112	8.71 \pm 0.49	9.87 \pm 0.55	1.51 \pm 0.04	13.4 \pm 1.5	10.3 \pm 0.6	6.48 \pm 0.48	8.59 \pm 0.84	130 \pm 3
ERBB2	1.13 \pm 0.65	U.L.Q. (<0.173)	0.261 \pm 0.032	1.21 \pm 0.26	0.229 \pm 0.029 *	0.185 \pm 0.045 *	0.736 \pm 0.212	1.02 \pm 0.19	0.238 \pm 0.052 *
VEGFR1	U.L.Q. (<0.149)	U.L.Q. (<0.0723)	U.L.Q. (<0.211)	U.L.Q. (<0.936)	3.00 \pm 0.84 *	U.L.Q. (<2.18)	1.47 \pm 0.22 *	U.L.Q. (<2.06)	4.09 \pm 0.75 *
VEGFR2	U.L.Q. (<0.296)	U.L.Q. (<0.0561)	U.L.Q. (<0.308)	U.L.Q. (<0.178)	U.L.Q. (<0.274)	U.L.Q. (<0.299)	U.L.Q. (<0.188)	U.L.Q. (<0.320)	U.L.Q. (<0.332)
VEGFR3	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
FLT3	N.D.	N.D.	N.D.	U.L.Q. (<0.127)	N.D.	N.D.	1.08 \pm 0.11 *	N.D.	N.D.
MET	U.L.Q. (<0.616)	U.L.Q. (<0.112)	U.L.Q. (<0.642)	U.L.Q. (<0.194)	U.L.Q. (<0.184)	U.L.Q. (<0.165)	U.L.Q. (<0.263)	U.L.Q. (<0.222)	U.L.Q. (<0.193)
IGFR	U.L.Q. (<0.297)	U.L.Q. (<0.0310)	U.L.Q. (<0.307)	U.L.Q. (<0.0401)	U.L.Q. (<0.366)	U.L.Q. (<0.362)	U.L.Q. (<0.0544)	U.L.Q. (<0.432)	U.L.Q. (<0.388)
CD33	U.L.Q. (<0.0699)	U.L.Q. (<0.0711)	0.435 \pm 0.112 *	0.199 \pm 0.045 *	U.L.Q. (<0.0434)	U.L.Q. (<0.308)	0.392 \pm 0.010 *	0.615 \pm 0.163	U.L.Q. (<0.0462)
CD37	0.593 \pm 0.023 *	0.400 \pm 0.016 *	0.364 \pm 0.058 *	0.177 \pm 0.027 *	0.337 \pm 0.023 *	0.264 \pm 0.008 *	0.201 \pm 0.025 *	0.462 \pm 0.056 *	0.446 \pm 0.024 *
c-kit	U.L.Q. (<0.585)	U.L.Q. (<0.176)	U.L.Q. (<0.573)	U.L.Q. (<0.314)	U.L.Q. (<0.661)	U.L.Q. (<0.674)	U.L.Q. (<0.160)	U.L.Q. (<0.894)	U.L.Q. (<0.845)
<u>ABC transporter proteins</u>									
MDR1	0.606 \pm 0.074	0.472 \pm 0.046 *	0.652 \pm 0.219	0.127 \pm 0.051 *	0.619 \pm 0.113	0.484 \pm 0.088	0.370 \pm 0.082	U.L.Q. (<0.106)	1.18 \pm 0.21
MRP1	0.591 \pm 0.081 *	0.614 \pm 0.083 *	0.274 \pm 0.024 *	0.455 \pm 0.055	0.124 \pm 0.043 *	0.502 \pm 0.100	0.447 \pm 0.025	1.48 \pm 0.13	0.260 \pm 0.002 *
MRP4	0.515 \pm 0.011	0.688 \pm 0.084	0.399 \pm 0.096	0.449 \pm 0.048	0.502 \pm 0.032	0.436 \pm 0.053	0.466 \pm 0.054	0.729 \pm 0.125	0.605 \pm 0.022
BCRP	1.07 \pm 0.05	U.L.Q. (<0.709)	1.37 \pm 0.07	0.184 \pm 0.048 *	1.78 \pm 0.18	1.69 \pm 0.13	0.795 \pm 0.037	1.31 \pm 0.11	3.86 \pm 0.23
<u>SLC transporter proteins</u>									
ASCT2	U.L.Q. (<0.573)	U.L.Q. (<0.177)	U.L.Q. (<0.490)	0.417 \pm 0.042	U.L.Q. (<0.351)	U.L.Q. (<0.412)	0.428 \pm 0.002 *	2.36 \pm 0.13	U.L.Q. (<0.484)
GLUT1	11.7 \pm 1.0	9.65 \pm 0.33	7.06 \pm 0.54	16.2 \pm 0.8	31.3 \pm 1.3	27.5 \pm 0.9	21.5 \pm 0.7	53.1 \pm 2.5	48.4 \pm 0.8
GLUT3/14	6.32 \pm 1.35	5.32 \pm 0.13	4.71 \pm 0.35	3.87 \pm 0.14	9.45 \pm 0.19	7.36 \pm 0.59	3.64 \pm 0.13	8.41 \pm 0.37	10.0 \pm 0.5
MCT4	2.31 \pm 0.29	2.38 \pm 0.06	1.45 \pm 0.14	1.13 \pm 0.08	1.09 \pm 0.18 *	3.24 \pm 0.28	1.40 \pm 0.15 *	7.13 \pm 0.86	3.44 \pm 0.40
PEPT2	1.51 \pm 0.02	U.L.Q. (<0.197)	0.689 \pm 0.141	1.04 \pm 0.17	0.562 \pm 0.181	U.L.Q. (<0.163)	1.08 \pm 0.27	0.645 \pm 0.077	1.22 \pm 0.11
MCT1	U.L.Q. (<1.72)	1.86 \pm 0.19	1.31 \pm 0.33 *	2.51 \pm 0.06	1.02 \pm 0.09 *	2.82 \pm 0.21	3.58 \pm 0.27	6.61 \pm 1.09	3.43 \pm 0.08
ENT1	1.38 \pm 0.26	0.738 \pm 0.009 *	0.811 \pm 0.104	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
4F2hc	1.97 \pm 0.57	2.84 \pm 0.09	1.77 \pm 0.28	3.80 \pm 0.29	3.22 \pm 0.04	4.29 \pm 0.24	4.18 \pm 0.29	4.29 \pm 0.08	6.39 \pm 0.47
PCFT	0.674 \pm 0.116	U.L.Q. (<0.100)	0.960 \pm 0.249	U.L.Q. (<0.203)	U.L.Q. (<0.210)	U.L.Q. (<0.202)	U.L.Q. (<0.193)	U.L.Q. (<0.213)	U.L.Q. (<0.192)
FATP1	3.92 \pm 0.36	U.L.Q. (<0.402)	2.70 \pm 0.11	4.25 \pm 0.58	1.54 \pm 0.27 *	3.12 \pm 0.13	1.10 \pm 0.06 *	2.11 \pm 0.15 *	2.06 \pm 0.22 *
<u>Other proteins</u>									
Claudin5	U.L.Q. (<1.74)	U.L.Q. (<0.503)	0.875 \pm 0.037	U.L.Q. (<0.0916)	0.495 \pm 0.069 *	U.L.Q. (<0.0879)	0.940 \pm 0.090 *	U.L.Q. (<0.0896)	1.39 \pm 0.16
JAM-A	3.06 \pm 0.32	N.D.	2.77 \pm 0.49	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
β -catenin	8.55 \pm 0.55	5.99 \pm 0.11	2.98 \pm 0.58	7.44 \pm 0.43	4.50 \pm 0.17	5.87 \pm 0.95	11.7 \pm 1.1	5.71 \pm 0.44	8.99 \pm 0.55
PECAM1	N.Q.	U.L.Q. (<0.125)	N.Q.	1.14 \pm 0.14 *	2.47 \pm 0.31	2.00 \pm 0.29 *	3.45 \pm 0.40	2.42 \pm 0.28 *	4.38 \pm 0.25 *
γ -gtp	0.834 \pm 0.078	U.L.Q. (<0.336)	0.826 \pm 0.114	U.L.Q. (<0.169)	U.L.Q. (<0.645)	1.33 \pm 0.32 *	0.747 \pm 0.048	2.29 \pm 0.14	1.27 \pm 0.02
<u>Membrane marker proteins</u>									
Na ⁺ /K ⁺ ATPase	71.6 \pm 2.8	45.8 \pm 2.0	38.1 \pm 1.8	49.3 \pm 2.1	103 \pm 4	46.9 \pm 2.9	42.2 \pm 1.0	42.0 \pm 1.4	116 \pm 6

Each value represents protein expression level in plasma membrane fraction (the mean \pm S.E.M., n=2-4 SRM/MRM transitions). U.L.Q. means “under the limit of quantification” and the value in brackets following U.L.Q. represents the value of the quantification limit (fmol/μg protein). *The reliability of the calculated values is considered to be less than that of other detected molecules, because in these cases only two among four SRM/MRM transitions gave detectable peak areas over 5000 counts. N.Q.; not quantified, N.D.; not detected.

Table 3-2 Quantitative values of proteins in plasma membrane fraction of brain tumor and non-tumor brain tissues (Continued)

	Quantitative value (fmol/μg protein of plasma membrane fraction)								
	GBM90	GBM91	GBM98	GBM99	GBM100	GBM105	GBM106/Autopsy	GBM107	GBM108
<u>Target molecules for molecular-targeted drugs</u>									
PDGFRα	0.281 ± 0.033 *	U.L.Q. (<0.139)	0.872 ± 0.144	0.389 ± 0.075 *	2.61 ± 0.25	U.L.Q. (<0.577)	U.L.Q. (<0.487)	U.L.Q. (<0.499)	U.L.Q. (<0.494)
PDGFRβ	U.L.Q. (<0.535)	2.06 ± 0.21	U.L.Q. (<0.677)	U.L.Q. (<0.652)	U.L.Q. (<0.431)	U.L.Q. (<0.885)	U.L.Q. (<0.549)	U.L.Q. (<0.624)	U.L.Q. (<0.850)
EGFR	23.2 ± 1.1	53.4 ± 5.5	20.2 ± 1.2	7.34 ± 0.96	25.8 ± 2.6	102 ± 14	U.L.Q. (<0.721)	3.98 ± 0.27 *	68.0 ± 9.7
ERBB2	U.L.Q. (<0.0816)	U.L.Q. (<0.0313)	U.L.Q. (<0.162)	U.L.Q. (<0.154)	U.L.Q. (<0.0855)	U.L.Q. (<0.238)	U.L.Q. (<0.322)	0.830 ± 0.141 *	1.79 ± 0.17
VEGFR1	3.64 ± 0.38 *	3.45 ± 0.73 *	U.L.Q. (<0.144)	U.L.Q. (<0.138)	U.L.Q. (<0.0576)	U.L.Q. (<0.400)	U.L.Q. (<0.337)	U.L.Q. (<0.396)	0.519 ± 0.146
VEGFR2	U.L.Q. (<0.342)	U.L.Q. (<0.318)	U.L.Q. (<0.935)	U.L.Q. (<0.679)	U.L.Q. (<0.823)	U.L.Q. (<1.62)	U.L.Q. (<1.69)	U.L.Q. (<1.33)	U.L.Q. (<1.17)
VEGFR3	N.D.	N.D.	U.L.Q. (<0.874)	U.L.Q. (<0.717)	U.L.Q. (<0.107)	U.L.Q. (<1.51)	U.L.Q. (<1.00)	U.L.Q. (<1.30)	U.L.Q. (<1.19)
FLT3	N.D.	N.D.	U.L.Q. (<0.264)	U.L.Q. (<0.278)	U.L.Q. (<0.453)	U.L.Q. (<0.453)	U.L.Q. (<0.392)	U.L.Q. (<0.393)	U.L.Q. (<0.382)
MET	U.L.Q. (<0.211)	U.L.Q. (<0.218)	U.L.Q. (<0.645)	U.L.Q. (<0.651)	U.L.Q. (<3.14)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
IGFR	U.L.Q. (<0.441)	U.L.Q. (<0.406)	U.L.Q. (<0.176)	U.L.Q. (<0.160)	U.L.Q. (<0.0863)	0.427 ± 0.010 *	U.L.Q. (<0.221)	U.L.Q. (<0.229)	U.L.Q. (<0.224)
CD33	U.L.Q. (<0.0462)	0.147 ± 0.034 *	U.L.Q. (<0.147)	U.L.Q. (<0.0518)	U.L.Q. (<0.228)	0.211 ± 0.105 *	0.430 ± 0.042 *	U.L.Q. (<0.266)	U.L.Q. (<0.239)
CD37	0.317 ± 0.009 *	0.657 ± 0.007 *	U.L.Q. (<0.104)	U.L.Q. (<0.0991)	0.339 ± 0.011 *	U.L.Q. (<0.174)	0.322 ± 0.130 *	U.L.Q. (<0.213)	U.L.Q. (<0.169)
c-kit	U.L.Q. (<0.802)	U.L.Q. (<0.826)	1.76 ± 0.39	U.L.Q. (<0.194)	U.L.Q. (<0.121)	U.L.Q. (<3.51)	U.L.Q. (<3.84)	U.L.Q. (<2.58)	U.L.Q. (<2.02)
<u>ABC transporter proteins</u>									
MDR1	0.377 ± 0.145 *	0.511 ± 0.141	U.L.Q. (<0.160)	U.L.Q. (<0.149)	U.L.Q. (<0.166)	0.801 ± 0.124 *	U.L.Q. (<0.244)	0.862 ± 0.198 *	U.L.Q. (<0.297)
MRP1	0.232 ± 0.020 *	0.971 ± 0.143	0.885 ± 0.149	0.712 ± 0.123	0.351 ± 0.144 *	0.447 ± 0.077 *	0.652 ± 0.118 *	0.616 ± 0.109 *	U.L.Q. (<0.517)
MRP4	0.345 ± 0.055	0.404 ± 0.018	0.355 ± 0.073	0.566 ± 0.099	U.L.Q. (<0.454)	1.04 ± 0.06	0.752 ± 0.019 *	U.L.Q. (<0.361)	0.566 ± 0.106
BCRP	1.66 ± 0.19	1.91 ± 0.13	U.L.Q. (<0.446)	U.L.Q. (<0.597)	U.L.Q. (<0.812)	3.89 ± 0.33	U.L.Q. (<0.681)	U.L.Q. (<0.745)	1.53 ± 0.25 *
<u>SLC transporter proteins</u>									
ASCT2	U.L.Q. (<0.446)	U.L.Q. (<0.435)	U.L.Q. (<0.628)	U.L.Q. (<0.523)	U.L.Q. (<0.503)	U.L.Q. (<0.332)	U.L.Q. (<1.75)	U.L.Q. (<1.31)	U.L.Q. (<1.32)
GLUT1	30.4 ± 1.1	22.3 ± 1.0	45.8 ± 2.0	29.7 ± 0.5	25.4 ± 3.8	52.4 ± 2.5	5.04 ± 0.34	18.5 ± 0.6	23.4 ± 1.7
GLUT3/14	5.16 ± 0.27	6.36 ± 0.22	16.3 ± 0.3	6.20 ± 0.30	7.52 ± 0.62	3.36 ± 0.32	2.63 ± 0.27	8.64 ± 0.67	7.07 ± 0.40
MCT4	4.03 ± 0.91	3.78 ± 0.48	4.79 ± 0.87	U.L.Q. (<1.15)	U.L.Q. (<2.57)	U.L.Q. (<1.98)	U.L.Q. (<3.15)	U.L.Q. (<3.11)	U.L.Q. (<2.73)
PEPT2	1.17 ± 0.10	0.729 ± 0.096	U.L.Q. (<0.241)	0.683 ± 0.059	U.L.Q. (<0.379)	1.50 ± 0.13	U.L.Q. (<0.447)	1.55 ± 0.16	1.99 ± 0.16
MCT1	2.28 ± 0.06	4.97 ± 0.06	4.04 ± 0.45 *	3.89 ± 0.64 *	3.00 ± 0.54	4.99 ± 0.68	2.26 ± 0.24 *	3.31 ± 1.23 *	3.55 ± 0.54
ENT1	N.D.	N.D.	U.L.Q. (<1.37)	U.L.Q. (<1.50)	U.L.Q. (<1.43)	2.78 ± 0.45 *	U.L.Q. (<1.57)	U.L.Q. (<1.41)	U.L.Q. (<1.81)
4F2hc	2.56 ± 0.10	3.52 ± 0.17	3.16 ± 0.75	4.59 ± 1.01	2.75 ± 0.56	2.19 ± 0.26	1.47 ± 0.10 *	1.84 ± 0.22	3.99 ± 0.86
PCFT	U.L.Q. (<0.187)	U.L.Q. (<0.201)	U.L.Q. (<0.416)	U.L.Q. (<0.352)	U.L.Q. (<0.397)	U.L.Q. (<0.602)	U.L.Q. (<0.579)	U.L.Q. (<0.519)	U.L.Q. (<0.588)
FATP1	2.90 ± 0.51	3.95 ± 0.31	1.85 ± 0.21 *	2.31 ± 0.35	3.06 ± 0.11	4.96 ± 0.61	4.21 ± 0.13	3.49 ± 0.45	3.26 ± 0.31
<u>Other proteins</u>									
Claudin5	U.L.Q. (<0.0885)	0.968 ± 0.125 *	U.L.Q. (<0.133)	0.427 ± 0.010 *	U.L.Q. (<0.131)	1.45 ± 0.05 *	0.527 ± 0.018 *	0.507 ± 0.177 *	U.L.Q. (<0.201)
JAM-A	N.D.	N.D.	4.01 ± 0.42	3.54 ± 0.19	2.26 ± 0.58	6.37 ± 0.53	3.13 ± 0.23	1.48 ± 0.31 *	3.87 ± 0.29
β-catenin	6.36 ± 0.93	7.21 ± 0.14	6.65 ± 0.84	7.93 ± 0.59	10.9 ± 0.9	9.89 ± 1.47	4.13 ± 0.34 *	6.52 ± 0.94	10.5 ± 2.0
PECAM1	U.L.Q. (<0.0631)	5.23 ± 0.51	U.L.Q. (<0.367)	U.L.Q. (<0.374)	U.L.Q. (<0.456)	3.25 ± 1.05 *	2.18 ± 0.27 *	1.11 ± 0.01 *	U.L.Q. (<0.585)
γ-gtp	U.L.Q. (<0.699)	1.42 ± 0.15 *	U.L.Q. (<0.584)	U.L.Q. (<0.569)	U.L.Q. (<0.578)	U.L.Q. (<1.03)	U.L.Q. (<1.35)	U.L.Q. (<1.12)	U.L.Q. (<1.17)
<u>Membrane marker proteins</u>									
Na ⁺ /K ⁺ ATPase	56.1 ± 2.2	37.0 ± 1.4	40.2 ± 2.8	68.0 ± 3.7	88.8 ± 5.8	60.9 ± 8.2	111 ± 9	90.0 ± 7.8	103 ± 6

Each value represents protein expression level in plasma membrane fraction (the mean ± S.E.M., n=2-4 SRM/MRM transitions). U.L.Q. means “under the limit of quantification” and the value in brackets following U.L.Q. represents the value of the quantification limit (fmol/μg protein). *The reliability of the calculated values is considered to be less than that of other detected molecules, because in these cases only two among four SRM/MRM transitions gave detectable peak areas over 5000 counts. N.Q.; not quantified, N.D.; not detected.

Table 3-2 Quantitative values of proteins in plasma membrane fraction of brain tumor and non-tumor brain tissues (Continued)

Quantitative value (fmol/μg protein of plasma membrane fraction)									
	GBM109	GBM113	GBM114	GBM115	GBM116	GBM117	GBM118	GBM119	GBM123
<u>Target molecules for molecular-targeted drugs</u>									
PDGFR α	U.L.Q. (<0.467)	U.L.Q. (<0.0288)	12.5 \pm 0.7	U.L.Q. (<0.0288)	U.L.Q. (<0.127)	26.1 \pm 0.7	U.L.Q. (<0.120)	U.L.Q. (<0.121)	0.713 \pm 0.017 *
PDGFR β	U.L.Q. (<0.648)	U.L.Q. (<0.149)	U.L.Q. (<0.114)	U.L.Q. (<0.164)	U.L.Q. (<0.143)	U.L.Q. (<0.520)	U.L.Q. (<0.359)	U.L.Q. (<0.467)	4.76 \pm 0.38
EGFR	46.4 \pm 6.3	17.7 \pm 0.7	U.L.Q. (<0.0862)	8.89 \pm 0.50	5.10 \pm 0.35	U.L.Q. (<0.0583)	9.17 \pm 0.69	6.12 \pm 0.40	U.L.Q. (<0.0619)
ERBB2	U.L.Q. (<0.315)	U.L.Q. (<0.633)	U.L.Q. (<0.0604)	0.413 \pm 0.005 *	0.826 \pm 0.191 *	U.L.Q. (<0.0672)	0.604 \pm 0.139 *	0.726 \pm 0.230 *	U.L.Q. (<0.0587)
VEGFR1	U.L.Q. (<0.321)	U.L.Q. (<0.0939)	U.L.Q. (<0.0555)	U.L.Q. (<0.114)	U.L.Q. (<0.0505)	U.L.Q. (<0.0894)	U.L.Q. (<0.0769)	U.L.Q. (<0.0572)	U.L.Q. (<0.0563)
VEGFR2	U.L.Q. (<1.09)	U.L.Q. (<0.0556)	U.L.Q. (<0.145)	U.L.Q. (<0.0869)	U.L.Q. (<0.160)	U.L.Q. (<0.221)	U.L.Q. (<0.219)	U.L.Q. (<0.133)	U.L.Q. (<0.321)
VEGFR3	U.L.Q. (<1.17)	U.L.Q. (<0.111)	U.L.Q. (<0.186)	U.L.Q. (<0.132)	U.L.Q. (<0.195)	U.L.Q. (<0.549)	U.L.Q. (<0.323)	U.L.Q. (<0.440)	U.L.Q. (<0.303)
FLT3	U.L.Q. (<0.371)	U.L.Q. (<0.201)	U.L.Q. (<0.206)	U.L.Q. (<0.222)	U.L.Q. (<0.162)	U.L.Q. (<0.341)	U.L.Q. (<0.374)	U.L.Q. (<0.345)	U.L.Q. (<0.0784)
MET	N.D.	U.L.Q. (<0.189)	U.L.Q. (<0.205)	U.L.Q. (<0.285)	U.L.Q. (<0.189)	U.L.Q. (<0.154)	U.L.Q. (<0.168)	U.L.Q. (<0.172)	U.L.Q. (<0.271)
IGFR	0.463 \pm 0.156 *	U.L.Q. (<0.0959)	U.L.Q. (<0.0515)	U.L.Q. (<0.109)	U.L.Q. (<0.0386)	U.L.Q. (<0.102)	U.L.Q. (<0.0937)	U.L.Q. (<0.0802)	U.L.Q. (<0.0957)
CD33	U.L.Q. (<0.232)	U.L.Q. (<0.149)	U.L.Q. (<0.0978)	0.243 \pm 0.039 *	0.813 \pm 0.185 *	U.L.Q. (<0.150)	U.L.Q. (<0.156)	U.L.Q. (<0.395)	U.L.Q. (<0.395)
CD37	U.L.Q. (<0.156)	0.321 \pm 0.005 *	0.513 \pm 0.081	0.152 \pm 0.045 *	0.459 \pm 0.078	0.294 \pm 0.081 *	0.224 \pm 0.013 *	0.667 \pm 0.121	0.554 \pm 0.073 *
c-kit	U.L.Q. (<1.93)	1.09 \pm 0.07	U.L.Q. (<0.835)	U.L.Q. (<0.296)	U.L.Q. (<0.708)	U.L.Q. (<0.585)	U.L.Q. (<0.535)	U.L.Q. (<0.556)	U.L.Q. (<0.351)
<u>ABC transporter proteins</u>									
MDR1	0.601 \pm 0.088 *	0.339 \pm 0.085	0.270 \pm 0.060 *	U.L.Q. (<0.0521)	0.558 \pm 0.114	U.L.Q. (<0.0837)	0.611 \pm 0.022	0.629 \pm 0.051	1.08 \pm 0.12
MRP1	U.L.Q. (<0.469)	1.72 \pm 0.10	1.32 \pm 0.19	0.641 \pm 0.003	1.60 \pm 0.11	0.332 \pm 0.042 *	0.472 \pm 0.056 *	0.371 \pm 0.068 *	1.05 \pm 0.07 *
MRP4	0.562 \pm 0.107 *	0.448 \pm 0.030	0.797 \pm 0.032	0.231 \pm 0.062	0.455 \pm 0.027	0.287 \pm 0.031	0.535 \pm 0.074	0.492 \pm 0.020	0.481 \pm 0.048
BCRP	2.01 \pm 0.34	0.436 \pm 0.122	1.56 \pm 0.12	0.414 \pm 0.061	0.939 \pm 0.063	0.698 \pm 0.036	1.67 \pm 0.06	1.64 \pm 0.07	1.94 \pm 0.04
<u>SLC transporter proteins</u>									
ASCT2	U.L.Q. (<1.30)	U.L.Q. (<0.411)	U.L.Q. (<0.361)	1.18 \pm 0.17 *	U.L.Q. (<0.325)	U.L.Q. (<0.150)	U.L.Q. (<0.184)	U.L.Q. (<0.225)	1.48 \pm 0.04 *
GLUT1	28.7 \pm 1.8	26.8 \pm 0.9	221 \pm 12	55.3 \pm 3.4	17.2 \pm 0.6	20.6 \pm 0.9	19.5 \pm 0.7	11.9 \pm 0.8	13.7 \pm 0.6
GLUT3/14	6.29 \pm 0.22	7.51 \pm 0.37	12.8 \pm 0.3	9.21 \pm 0.17	6.15 \pm 0.18	8.70 \pm 0.36	12.3 \pm 0.4	2.70 \pm 0.19	2.00 \pm 0.23
MCT4	U.L.Q. (<1.40)	1.03 \pm 0.11	1.73 \pm 0.23	1.41 \pm 0.14	2.70 \pm 0.29	1.35 \pm 0.10 *	1.71 \pm 0.21 *	2.08 \pm 0.28	U.L.Q. (<0.167)
PEPT2	1.11 \pm 0.04	0.636 \pm 0.062	U.L.Q. (<0.0475)	0.362 \pm 0.061	1.34 \pm 0.09	0.719 \pm 0.055	1.78 \pm 0.10	0.903 \pm 0.042	U.L.Q. (<0.0326)
MCT1	4.02 \pm 0.64 *	4.38 \pm 0.22	2.56 \pm 0.10	4.64 \pm 0.09	4.05 \pm 0.11	2.43 \pm 0.10	3.53 \pm 0.14	4.09 \pm 0.16	2.19 \pm 0.27 *
ENT1	1.54 \pm 0.49 *	1.10 \pm 0.18	6.08 \pm 0.30	1.30 \pm 0.07	0.999 \pm 0.104	U.L.Q. (<0.204)	1.35 \pm 0.12	0.979 \pm 0.115 *	1.89 \pm 0.16
4F2hc	3.69 \pm 0.88	3.78 \pm 0.37	1.74 \pm 0.12	3.12 \pm 0.52	1.65 \pm 0.26	2.72 \pm 0.26	4.04 \pm 0.10	4.40 \pm 0.10	2.72 \pm 0.07
PCFT	U.L.Q. (<0.612)	U.L.Q. (<0.0945)	U.L.Q. (<0.0628)	U.L.Q. (<0.0784)	0.755 \pm 0.079 *	U.L.Q. (<0.254)	U.L.Q. (<0.209)	U.L.Q. (<0.230)	U.L.Q. (<0.243)
FATP1	3.86 \pm 0.81	3.01 \pm 0.18	2.08 \pm 0.10	1.89 \pm 0.08	5.99 \pm 0.28	2.55 \pm 0.29	4.95 \pm 0.34	5.51 \pm 0.92	3.85 \pm 0.28
<u>Other proteins</u>									
Claudin5	0.902 \pm 0.036 *	U.L.Q. (<0.130)	1.16 \pm 0.04	U.L.Q. (<0.137)	U.L.Q. (<0.0539)	U.L.Q. (<0.133)	U.L.Q. (<0.123)	U.L.Q. (<0.129)	0.954 \pm 0.046 *
JAM-A	3.60 \pm 0.38	3.98 \pm 0.27	10.2 \pm 0.4	5.02 \pm 0.45	7.93 \pm 0.37	1.00 \pm 0.12 *	2.92 \pm 0.26 *	6.78 \pm 0.35	3.60 \pm 0.21
β -catenin	9.52 \pm 0.85	8.38 \pm 0.41	5.95 \pm 0.38	4.66 \pm 0.29	9.98 \pm 0.48	5.10 \pm 0.39	10.0 \pm 0.7	10.3 \pm 0.7	9.35 \pm 0.48
PECAM1	2.00 \pm 0.155 *	U.L.Q. (<0.0419)	U.L.Q. (<0.486)	U.L.Q. (<0.0813)	U.L.Q. (<0.124)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
γ -gtp	U.L.Q. (<0.971)	0.894 \pm 0.099	U.L.Q. (<0.0973)	U.L.Q. (<0.120)	0.691 \pm 0.039 *	U.L.Q. (<0.196)	U.L.Q. (<0.203)	U.L.Q. (<0.186)	0.906 \pm 0.134 *
<u>Membrane marker proteins</u>									
Na ⁺ /K ⁺ ATPase	111 \pm 7	104 \pm 8	35.6 \pm 2.8	45.8 \pm 2.9	83.6 \pm 4.6	115 \pm 4	165 \pm 7	82.7 \pm 3.8	56.3 \pm 2.2

Each value represents protein expression level in plasma membrane fraction (the mean \pm S.E.M., n=2-4 SRM/MRM transitions). U.L.Q. means “under the limit of quantification” and the value in brackets following U.L.Q. represents the value of the quantification limit (fmol/μg protein). *The reliability of the calculated values is considered to be less than that of other detected molecules, because in these cases only two among four SRM/MRM transitions gave detectable peak areas over 5000 counts. N.Q.; not quantified, N.D.; not detected.

Table 3-2 Quantitative values of proteins in plasma membrane fraction of brain tumor and non-tumor brain tissues (Continued)

	Quantitative value (fmol/μg protein of plasma membrane fraction)								
	GBM124	GBM125	GBM126	GBM127	GBM130	GBM131	GBM132	GBM133	GBM134
<u>Target molecules for molecular-targeted drugs</u>									
PDGFR α	U.L.Q. (<0.0668)	U.L.Q. (<0.172)	U.L.Q. (<0.437)	U.L.Q. (<0.165)	2.43 \pm 0.09	2.18 \pm 0.04	8.12 \pm 0.43	1.39 \pm 0.08	U.L.Q. (<0.0786)
PDGFR β	U.L.Q. (<0.318)	U.L.Q. (<0.158)	U.L.Q. (<0.454)	U.L.Q. (<0.200)	U.L.Q. (<0.224)	U.L.Q. (<0.291)	U.L.Q. (<0.321)	U.L.Q. (<0.236)	U.L.Q. (<0.320)
EGFR	3.43 \pm 0.27	2.79 \pm 0.32	4.61 \pm 0.45	1.57 \pm 0.18	0.803 \pm 0.045	0.502 \pm 0.043	U.L.Q. (<0.0860)	U.L.Q. (<0.0601)	2.85 \pm 0.09
ERBB2	U.L.Q. (<0.0589)	U.L.Q. (<0.0620)	U.L.Q. (<0.0712)	U.L.Q. (<0.0624)	U.L.Q. (<0.0664)	U.L.Q. (<0.0549)	U.L.Q. (<0.0914)	U.L.Q. (<0.0693)	U.L.Q. (<0.0542)
VEGFR1	U.L.Q. (<0.0710)	U.L.Q. (<0.0730)	U.L.Q. (<0.0678)	U.L.Q. (<0.0820)	U.L.Q. (<0.0986)	U.L.Q. (<0.0713)	U.L.Q. (<0.119)	U.L.Q. (<0.104)	U.L.Q. (<0.0760)
VEGFR2	U.L.Q. (<0.452)	U.L.Q. (<0.313)	U.L.Q. (<0.226)	U.L.Q. (<0.362)	U.L.Q. (<0.380)	U.L.Q. (<0.427)	U.L.Q. (<0.458)	U.L.Q. (<0.416)	U.L.Q. (<0.466)
VEGFR3	U.L.Q. (<0.0967)	U.L.Q. (<0.358)	U.L.Q. (<0.534)	U.L.Q. (<0.101)	U.L.Q. (<0.158)	U.L.Q. (<0.0531)	U.L.Q. (<0.195)	U.L.Q. (<0.139)	U.L.Q. (<0.0599)
FLT3	U.L.Q. (<0.135)	U.L.Q. (<0.371)	U.L.Q. (<0.342)	U.L.Q. (<0.0523)	U.L.Q. (<0.0461)	U.L.Q. (<0.137)	U.L.Q. (<0.0547)	U.L.Q. (<0.0805)	U.L.Q. (<0.136)
MET	U.L.Q. (<0.298)	U.L.Q. (<0.176)	U.L.Q. (<0.149)	U.L.Q. (<0.304)	U.L.Q. (<0.378)	U.L.Q. (<0.413)	U.L.Q. (<0.468)	U.L.Q. (<0.777)	U.L.Q. (<0.391)
IGFR	U.L.Q. (<0.198)	U.L.Q. (<0.104)	U.L.Q. (<0.108)	U.L.Q. (<0.120)	U.L.Q. (<0.128)	U.L.Q. (<0.185)	U.L.Q. (<0.141)	U.L.Q. (<0.130)	U.L.Q. (<0.192)
CD33	U.L.Q. (<0.123)	U.L.Q. (<0.142)	U.L.Q. (<0.159)	U.L.Q. (<0.160)	U.L.Q. (<0.160)	U.L.Q. (<0.123)	U.L.Q. (<0.170)	U.L.Q. (<0.203)	U.L.Q. (<0.128)
CD37	0.306 \pm 0.004 *	0.147 \pm 0.025 *	0.305 \pm 0.034 *	0.330 \pm 0.074 *	0.296 \pm 0.034 *	0.149 \pm 0.002 *	0.994 \pm 0.088 *	U.L.Q. (<0.0491)	0.319 \pm 0.000 *
c-kit	U.L.Q. (<0.352)	U.L.Q. (<0.358)	U.L.Q. (<0.558)	U.L.Q. (<0.375)	1.38 \pm 0.32 *	U.L.Q. (<0.113)	U.L.Q. (<0.460)	U.L.Q. (<0.438)	U.L.Q. (<0.104)
<u>ABC transporter proteins</u>									
MDR1	U.L.Q. (<0.0544)	U.L.Q. (<0.0826)	U.L.Q. (<0.0988)	0.602 \pm 0.068	1.09 \pm 0.08	0.504 \pm 0.114	0.459 \pm 0.022 *	U.L.Q. (<0.0486)	0.780 \pm 0.107
MRP1	0.431 \pm 0.001 *	0.464 \pm 0.100 *	U.L.Q. (<0.496)	0.693 \pm 0.060 *	U.L.Q. (<0.200)	U.L.Q. (<0.111)	U.L.Q. (<0.238)	U.L.Q. (<0.0901)	0.445 \pm 0.051 *
MRP4	0.685 \pm 0.048	0.471 \pm 0.045	0.558 \pm 0.062	0.514 \pm 0.085	0.301 \pm 0.028	0.250 \pm 0.054	1.00 \pm 0.05	0.411 \pm 0.063	0.397 \pm 0.041
BCRP	0.887 \pm 0.010	U.L.Q. (<0.0641)	1.09 \pm 0.07	1.67 \pm 0.10	2.74 \pm 0.10	0.298 \pm 0.071	1.52 \pm 0.11	0.495 \pm 0.070 *	0.426 \pm 0.014 *
<u>SLC transporter proteins</u>									
ASCT2	0.679 \pm 0.086 *	U.L.Q. (<0.169)	U.L.Q. (<0.178)	U.L.Q. (<0.218)	U.L.Q. (<0.245)	U.L.Q. (<0.135)	U.L.Q. (<0.267)	U.L.Q. (<0.640)	U.L.Q. (<0.175)
GLUT1	107 \pm 4	23.5 \pm 0.9	21.9 \pm 1.2	54.9 \pm 1.2	15.4 \pm 0.6	16.2 \pm 0.6	33.5 \pm 0.9	2.99 \pm 0.17	14.7 \pm 0.4
GLUT3/14	7.52 \pm 0.14	5.05 \pm 0.25	11.7 \pm 0.2	11.0 \pm 0.5	2.01 \pm 0.23	16.1 \pm 0.4	2.93 \pm 0.42	1.63 \pm 0.15	3.48 \pm 0.26
MCT4	3.82 \pm 0.23	1.83 \pm 0.23 *	1.27 \pm 0.01 *	3.64 \pm 0.44	U.L.Q. (<0.155)	0.463 \pm 0.055 *	U.L.Q. (<0.182)	U.L.Q. (<0.239)	0.905 \pm 0.007 *
PEPT2	1.81 \pm 0.13	1.08 \pm 0.08	3.86 \pm 0.08	U.L.Q. (<0.170)	1.84 \pm 0.08	1.42 \pm 0.05	0.915 \pm 0.048	1.33 \pm 0.05	1.26 \pm 0.06
MCT1	10.9 \pm 0.4	2.80 \pm 0.12	2.94 \pm 0.19	5.54 \pm 0.24	U.L.Q. (<0.557)	1.21 \pm 0.09	1.88 \pm 0.15 *	U.L.Q. (<0.335)	4.69 \pm 0.18
ENT1	2.71 \pm 0.14	0.539 \pm 0.050 *	1.22 \pm 0.14	1.28 \pm 0.15	0.813 \pm 0.022 *	1.39 \pm 0.09	1.92 \pm 0.03	U.L.Q. (<0.260)	0.894 \pm 0.094
4F2hc	2.52 \pm 0.28	3.14 \pm 0.17	3.14 \pm 0.16	3.60 \pm 0.12	4.57 \pm 0.14	5.87 \pm 0.34	4.97 \pm 0.49	2.03 \pm 0.12	3.27 \pm 0.05
PCFT	U.L.Q. (<0.140)	U.L.Q. (<0.228)	U.L.Q. (<0.168)	U.L.Q. (<0.256)	U.L.Q. (<0.432)	U.L.Q. (<0.132)	U.L.Q. (<0.641)	U.L.Q. (<0.436)	U.L.Q. (<0.123)
FATP1	5.41 \pm 0.91	5.24 \pm 0.32	3.77 \pm 0.28	4.23 \pm 0.37	6.89 \pm 0.59	1.52 \pm 0.17 *	7.64 \pm 0.46	2.56 \pm 0.33	4.20 \pm 0.44
<u>Other proteins</u>									
Claudin5	U.L.Q. (<0.213)	U.L.Q. (<0.133)	U.L.Q. (<0.138)	U.L.Q. (<0.150)	U.L.Q. (<0.311)	U.L.Q. (<0.197)	U.L.Q. (<0.377)	U.L.Q. (<0.218)	U.L.Q. (<0.197)
JAM-A	5.08 \pm 0.36	2.15 \pm 0.16	1.16 \pm 0.13 *	3.07 \pm 0.13	1.20 \pm 0.06 *	1.17 \pm 0.17 *	4.50 \pm 0.47	U.L.Q. (<0.621)	3.03 \pm 0.06 *
β -catenin	10.6 \pm 1.0	8.02 \pm 0.30	8.86 \pm 0.35	10.2 \pm 0.8	7.47 \pm 0.53	7.03 \pm 0.68	8.53 \pm 0.57	5.25 \pm 0.21	6.82 \pm 0.75
PECAM1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
γ -gtp	U.L.Q. (<0.149)	U.L.Q. (<0.239)	U.L.Q. (<0.239)	U.L.Q. (<0.261)	U.L.Q. (<0.312)	U.L.Q. (<0.140)	U.L.Q. (<0.309)	U.L.Q. (<0.297)	U.L.Q. (<0.127)
<u>Membrane marker proteins</u>									
Na ⁺ /K ⁺ ATPase	98.8 \pm 5.4	82.4 \pm 4.8	124 \pm 7	76.3 \pm 1.5	141 \pm 7	250 \pm 9	112 \pm 5	85.0 \pm 2.9	75.1 \pm 2.2

Each value represents protein expression level in plasma membrane fraction (the mean \pm S.E.M., n=2-4 SRM/MRM transitions). U.L.Q. means “under the limit of quantification” and the value in brackets following U.L.Q. represents the value of the quantification limit (fmol/μg protein). *The reliability of the calculated values is considered to be less than that of other detected molecules, because in these cases only two among four SRM/MRM transitions gave detectable peak areas over 5000 counts. N.Q.; not quantified, N.D.; not detected.

Table 3-2 Quantitative values of proteins in plasma membrane fraction of brain tumor and non-tumor brain tissues (Continued)

		Quantitative value (fmol/μg protein of plasma membrane fraction)								
		GBM135	GBM136	GBM137	GBM138	Autopsy	Rec24	Rec29	Rec44	Rec45
<u>Target molecules for molecular-targeted drugs</u>										
PDGFRα	U.L.Q. (<0.130)	9.92 ± 0.44	5.04 ± 0.41	U.L.Q. (<0.138)	6.46 ± 0.74	U.L.Q. (<0.374)	U.L.Q. (<0.375)	0.276 ± 0.042 *	17.9 ± 0.7	
PDGFRβ	U.L.Q. (<0.373)	U.L.Q. (<0.364)	U.L.Q. (<0.412)	U.L.Q. (<0.414)	U.L.Q. (<0.358)	U.L.Q. (<0.301)	N.Q.	U.L.Q. (<0.578)	U.L.Q. (<0.539)	
EGFR	122 ± 8	2.00 ± 0.21	U.L.Q. (<0.213)	97.8 ± 6.1	U.L.Q. (<0.0770)	0.288 ± 0.010	N.Q.	0.881 ± 0.054	1.15 ± 0.27	
ERBB2	U.L.Q. (<0.180)	U.L.Q. (<0.181)	U.L.Q. (<0.0340)	U.L.Q. (<0.180)	U.L.Q. (<0.0959)	0.345 ± 0.083	U.L.Q. (<0.159)	U.L.Q. (<0.0433)	U.L.Q. (<0.0531)	
VEGFR1	U.L.Q. (<0.142)	U.L.Q. (<0.148)	U.L.Q. (<0.162)	U.L.Q. (<0.132)	U.L.Q. (<0.153)	U.L.Q. (<0.206)	N.Q.	U.L.Q. (<2.03)	U.L.Q. (<1.98)	
VEGFR2	U.L.Q. (<0.743)	U.L.Q. (<0.805)	U.L.Q. (<0.789)	U.L.Q. (<0.750)	U.L.Q. (<0.946)	U.L.Q. (<0.291)	N.Q.	U.L.Q. (<0.298)	U.L.Q. (<0.300)	
VEGFR3	U.L.Q. (<0.509)	U.L.Q. (<0.505)	U.L.Q. (<0.445)	U.L.Q. (<0.426)	U.L.Q. (<0.130)	N.D.	N.Q.	N.D.	N.D.	
FLT3	U.L.Q. (<0.193)	U.L.Q. (<0.192)	U.L.Q. (<0.173)	U.L.Q. (<0.216)	U.L.Q. (<0.356)	N.D.	N.Q.	N.D.	N.D.	
MET	U.L.Q. (<0.920)	U.L.Q. (<0.915)	17.6 ± 0.3 *	U.L.Q. (<0.929)	U.L.Q. (<2.59)	U.L.Q. (<0.644)	N.Q.	U.L.Q. (<0.190)	U.L.Q. (<0.205)	
IGFR	U.L.Q. (<0.152)	U.L.Q. (<0.156)	U.L.Q. (<0.159)	U.L.Q. (<0.146)	U.L.Q. (<0.100)	U.L.Q. (<0.291)	N.Q.	U.L.Q. (<0.367)	U.L.Q. (<0.360)	
CD33	U.L.Q. (<0.104)	U.L.Q. (<0.104)	U.L.Q. (<0.110)	U.L.Q. (<0.116)	U.L.Q. (<0.126)	0.663 ± 0.130 *	N.Q.	U.L.Q. (<0.291)	0.151 ± 0.023 *	
CD37	0.449 ± 0.044 *	0.322 ± 0.033 *	U.L.Q. (<0.0950)	0.338 ± 0.028 *	U.L.Q. (<0.167)	0.518 ± 0.047 *	N.Q.	U.L.Q. (<0.157)	0.271 ± 0.009 *	
c-kit	U.L.Q. (<0.230)	6.71 ± 0.63	U.L.Q. (<0.185)	U.L.Q. (<0.135)	U.L.Q. (<0.365)	U.L.Q. (<0.600)	N.Q.	U.L.Q. (<0.893)	9.97 ± 0.54	
<u>ABC transporter proteins</u>										
MDR1	0.764 ± 0.073	U.L.Q. (<0.0885)	U.L.Q. (<0.0888)	U.L.Q. (<0.0929)	U.L.Q. (<0.131)	0.539 ± 0.166	0.304 ± 0.127 *	U.L.Q. (<0.123)	1.07 ± 0.19	
MRP1	U.L.Q. (<0.151)	0.950 ± 0.162 *	U.L.Q. (<0.155)	0.426 ± 0.076 *	0.443 ± 0.146 *	0.226 ± 0.105 *	N.Q.	0.165 ± 0.031 *	0.574 ± 0.136	
MRP4	0.505 ± 0.036	0.497 ± 0.021	0.273 ± 0.015	0.659 ± 0.071	U.L.Q. (<0.316)	0.594 ± 0.077 *	0.492 ± 0.088 *	0.299 ± 0.008	0.510 ± 0.059	
BCRP	2.69 ± 0.14	0.877 ± 0.111 *	1.29 ± 0.08 *	0.855 ± 0.093 *	U.L.Q. (<0.661)	0.546 ± 0.068	1.56 ± 0.30	0.962 ± 0.042 *	2.89 ± 0.14	
<u>SLC transporter proteins</u>										
ASCT2	U.L.Q. (<0.356)	U.L.Q. (<0.342)	U.L.Q. (<0.372)	1.98 ± 0.32 *	2.27 ± 0.29	U.L.Q. (<0.597)	U.L.Q. (<0.897)	U.L.Q. (<0.517)	1.13 ± 0.07 *	
GLUT1	17.2 ± 0.6	30.1 ± 1.1	21.1 ± 0.2	34.0 ± 0.5	9.79 ± 1.06	3.93 ± 0.10	316 ± 17	4.72 ± 0.28	14.8 ± 0.8	
GLUT3/14	2.37 ± 0.14	2.29 ± 0.05	3.02 ± 0.16	5.59 ± 0.43	3.50 ± 0.43	6.80 ± 1.22	4.81 ± 1.11	5.80 ± 0.15	2.14 ± 0.30	
MCT4	U.L.Q. (<1.40)	2.57 ± 0.15	U.L.Q. (<1.44)	U.L.Q. (<1.36)	U.L.Q. (<2.96)	2.38 ± 0.44	2.01 ± 0.09 *	1.24 ± 0.04 *	1.53 ± 0.01 *	
PEPT2	1.11 ± 0.05	U.L.Q. (<0.0924)	0.496 ± 0.015 *	0.668 ± 0.045 *	U.L.Q. (<0.322)	1.31 ± 0.11	0.905 ± 0.039	1.04 ± 0.10	0.471 ± 0.128	
MCT1	4.97 ± 0.54	7.65 ± 0.12	2.80 ± 0.33	11.6 ± 0.8	U.L.Q. (<1.10)	U.L.Q. (<1.29)	2.12 ± 0.09	1.17 ± 0.22	2.12 ± 0.36	
ENT1	0.921 ± 0.116 *	0.788 ± 0.139 *	0.776 ± 0.047 *	1.65 ± 0.08	U.L.Q. (<0.330)	1.12 ± 0.15	2.35 ± 0.18	N.D.	N.D.	
4F2hc	2.79 ± 0.15	3.09 ± 0.12	1.74 ± 0.10	2.68 ± 0.16	3.10 ± 0.30	1.77 ± 0.11	0.613 ± 0.048	2.56 ± 0.08	4.52 ± 0.18	
PCFT	U.L.Q. (<0.233)	U.L.Q. (<0.132)	U.L.Q. (<0.142)	U.L.Q. (<0.177)	U.L.Q. (<0.338)	1.42 ± 0.30	0.560 ± 0.175	U.L.Q. (<0.206)	U.L.Q. (<0.196)	
FATP1	6.46 ± 0.56	2.85 ± 0.85 *	4.21 ± 0.44 *	6.06 ± 0.55	2.96 ± 0.84	3.49 ± 0.18	U.L.Q. (<1.35)	2.56 ± 0.08 *	4.70 ± 0.38	
<u>Other proteins</u>										
Claudin5	U.L.Q. (<0.264)	U.L.Q. (<0.245)	U.L.Q. (<0.263)	U.L.Q. (<0.296)	U.L.Q. (<0.246)	1.01 ± 0.07 *	U.L.Q. (<0.928)	U.L.Q. (<0.0918)	0.807 ± 0.072 *	
JAM-A	4.58 ± 0.46	3.59 ± 0.54 *	1.72 ± 0.26 *	3.18 ± 0.13	0.699 ± 0.006 *	2.44 ± 0.22	2.81 ± 0.36	N.D.	N.D.	
β-catenin	8.95 ± 0.63	9.32 ± 0.64	6.33 ± 0.51	19.0 ± 1.1	3.42 ± 0.30	4.85 ± 0.19	0.964 ± 0.297	5.65 ± 0.21	4.17 ± 0.74	
PECAM1	N.Q.	N.Q.	N.Q.	N.Q.	U.L.Q. (<0.322)	N.Q.	N.Q.	U.L.Q. (<0.0394)	2.09 ± 0.30 *	
γ-gtp	U.L.Q. (<0.219)	U.L.Q. (<0.205)	U.L.Q. (<0.197)	U.L.Q. (<0.220)	U.L.Q. (<0.605)	1.03 ± 0.11	0.293 ± 0.059	U.L.Q. (<0.661)	0.812 ± 0.156 *	
<u>Membrane marker proteins</u>										
Na ⁺ /K ⁺ ATPase	57.4 ± 2.3	43.9 ± 1.4	69.6 ± 2.6	82.3 ± 3.5	79.4 ± 5.8	74.1 ± 2.3	N.Q.	115 ± 3	62.8 ± 2.1	

Each value represents protein expression level in plasma membrane fraction (the mean ± S.E.M., n=2-4 SRM/MRM transitions). U.L.Q. means “under the limit of quantification” and the value in brackets following U.L.Q. represents the value of the quantification limit (fmol/μg protein). *The reliability of the calculated values is considered to be less than that of other detected molecules, because in these cases only two among four SRM/MRM transitions gave detectable peak areas over 5000 counts. N.Q.; not quantified, N.D.; not detected.

Table 3-2 Quantitative values of proteins in plasma membrane fraction of brain tumor and non-tumor brain tissues (Continued)

	Quantitative value (fmol/μg protein of plasma membrane fraction)								
	Rec48	Rec49	Rec51	Rec53/MRI+	Rec53/MRI-	Rec56	Rec58	Rec59	Meta5
<u>Target molecules for molecular-targeted drugs</u>									
PDGFRα	U.L.Q. (<0.0649)	U.L.Q. (<0.0514)	U.L.Q. (<0.0514)	U.L.Q. (<0.0301)	U.L.Q. (<0.0352)	U.L.Q. (<0.105)	U.L.Q. (<0.197)	U.L.Q. (<0.0975)	U.L.Q. (<0.476)
PDGFRβ	U.L.Q. (<0.422)	U.L.Q. (<0.120)	U.L.Q. (<0.0541)	U.L.Q. (<0.135)	U.L.Q. (<0.164)	U.L.Q. (<0.116)	U.L.Q. (<0.502)	U.L.Q. (<0.318)	U.L.Q. (<0.269)
EGFR	1.68 ± 0.03	0.869 ± 0.053	3.74 ± 0.20	4.36 ± 0.25	3.32 ± 0.34	3.82 ± 0.16	0.430 ± 0.071 *	24.4 ± 0.8	7.10 ± 0.54
ERBB2	U.L.Q. (<0.0497)	U.L.Q. (<0.170)	U.L.Q. (<0.160)	U.L.Q. (<0.285)	U.L.Q. (<0.352)	U.L.Q. (<0.0639)	U.L.Q. (<0.117)	0.403 ± 0.017 *	1.63 ± 0.15
VEGFR1	U.L.Q. (<1.60)	U.L.Q. (<0.0718)	U.L.Q. (<0.0678)	U.L.Q. (<0.163)	U.L.Q. (<0.161)	U.L.Q. (<0.0545)	U.L.Q. (<0.178)	U.L.Q. (<0.0710)	U.L.Q. (<0.174)
VEGFR2	U.L.Q. (<0.0923)	U.L.Q. (<0.0664)	U.L.Q. (<0.0984)	U.L.Q. (<0.706)	U.L.Q. (<0.637)	U.L.Q. (<0.159)	U.L.Q. (<0.516)	U.L.Q. (<0.549)	U.L.Q. (<0.276)
VEGFR3	N.D.	N.D.	N.D.	U.L.Q. (<0.238)	U.L.Q. (<0.239)	U.L.Q. (<0.126)	U.L.Q. (<0.493)	U.L.Q. (<0.0661)	N.D.
FLT3	U.L.Q. (<0.734)	N.D.	N.D.	U.L.Q. (<0.245)	U.L.Q. (<0.193)	U.L.Q. (<0.154)	U.L.Q. (<0.0681)	U.L.Q. (<0.118)	N.D.
MET	U.L.Q. (<0.227)	U.L.Q. (<0.135)	U.L.Q. (<0.253)	U.L.Q. (<0.611)	U.L.Q. (<0.539)	U.L.Q. (<0.176)	U.L.Q. (<0.575)	U.L.Q. (<0.257)	U.L.Q. (<0.637)
IGFR	U.L.Q. (<0.251)	U.L.Q. (<0.0526)	U.L.Q. (<0.0951)	U.L.Q. (<0.0620)	U.L.Q. (<0.0699)	U.L.Q. (<0.0295)	U.L.Q. (<0.198)	U.L.Q. (<0.207)	U.L.Q. (<0.280)
CD33	U.L.Q. (<0.0311)	U.L.Q. (<0.0376)	U.L.Q. (<0.0407)	U.L.Q. (<0.118)	U.L.Q. (<0.142)	U.L.Q. (<0.0900)	U.L.Q. (<0.296)	U.L.Q. (<0.125)	U.L.Q. (<0.0669)
CD37	0.355 ± 0.003 *	U.L.Q. (<0.0595)	U.L.Q. (<0.0653)	U.L.Q. (<0.0522)	U.L.Q. (<0.0539)	0.199 ± 0.042 *	U.L.Q. (<0.150)	0.328 ± 0.009 *	0.897 ± 0.008 *
c-kit	U.L.Q. (<0.545)	U.L.Q. (<0.0393)	U.L.Q. (<0.103)	U.L.Q. (<0.191)	U.L.Q. (<0.203)	1.23 ± 0.27	U.L.Q. (<0.490)	U.L.Q. (<0.110)	U.L.Q. (<0.613)
<u>ABC transporter proteins</u>									
MDR1	U.L.Q. (<0.190)	U.L.Q. (<0.0768)	U.L.Q. (<0.0765)	1.48 ± 0.02	0.533 ± 0.082	0.409 ± 0.027 *	0.541 ± 0.023 *	0.396 ± 0.083	0.585 ± 0.029
MRP1	0.810 ± 0.022 *	U.L.Q. (<0.0966)	U.L.Q. (<0.0617)	0.231 ± 0.007 *	U.L.Q. (<0.0699)	0.218 ± 0.011 *	U.L.Q. (<0.236)	0.575 ± 0.075 *	2.46 ± 0.23
MRP4	0.608 ± 0.033	0.343 ± 0.030	0.442 ± 0.006	0.948 ± 0.054	0.577 ± 0.053	0.650 ± 0.024	0.397 ± 0.031 *	0.661 ± 0.035	0.560 ± 0.127
BCRP	U.L.Q. (<0.798)	U.L.Q. (<0.635)	U.L.Q. (<0.626)	4.25 ± 0.14	1.44 ± 0.17	1.25 ± 0.09	1.81 ± 0.06	0.754 ± 0.076	0.738 ± 0.206
<u>SLC transporter proteins</u>									
ASCT2	1.17 ± 0.13 *	U.L.Q. (<0.164)	U.L.Q. (<0.131)	U.L.Q. (<0.0902)	U.L.Q. (<0.0823)	U.L.Q. (<0.367)	U.L.Q. (<0.585)	U.L.Q. (<0.169)	4.44 ± 1.15
GLUT1	10.6 ± 0.5	2.81 ± 0.08	7.79 ± 0.23	36.8 ± 2.5	9.43 ± 0.88	42.0 ± 2.3	16.0 ± 1.0	13.1 ± 0.3	78.9 ± 1.3
GLUT3/14	3.69 ± 0.23	5.76 ± 0.17	2.50 ± 0.13	N.D.	7.36 ± 0.28	11.0 ± 0.7	2.37 ± 0.27	3.70 ± 0.27	14.0 ± 1.6
MCT4	2.48 ± 0.17	U.L.Q. (<0.793)	U.L.Q. (<1.12)	U.L.Q. (<0.155)	U.L.Q. (<0.111)	U.L.Q. (<0.0602)	U.L.Q. (<0.200)	1.05 ± 0.10	12.1 ± 0.9
PEPT2	U.L.Q. (<0.198)	1.70 ± 0.08	1.09 ± 0.04	U.L.Q. (<0.134)	2.53 ± 0.20	3.28 ± 0.27	1.77 ± 0.10	1.95 ± 0.13	U.L.Q. (<0.538)
MCT1	1.71 ± 0.28	U.L.Q. (<0.198)	0.141 ± 0.100 *	2.40 ± 0.31	1.58 ± 0.23	1.46 ± 0.11	1.97 ± 0.05 *	4.13 ± 0.22	U.L.Q. (<0.998)
ENT1	N.D.	U.L.Q. (<0.206)	U.L.Q. (<0.200)	3.78 ± 0.29	1.59 ± 0.23 *	1.99 ± 0.15	1.24 ± 0.14	0.807 ± 0.085 *	1.97 ± 0.07
4F2hc	1.99 ± 0.03	2.86 ± 0.25	2.65 ± 0.05	5.42 ± 0.50	4.05 ± 0.20	4.57 ± 0.57	4.97 ± 0.20	2.98 ± 0.02	2.24 ± 0.14
PCFT	U.L.Q. (<0.208)	U.L.Q. (<0.116)	U.L.Q. (<0.140)	1.52 ± 0.17	U.L.Q. (<0.153)	U.L.Q. (<0.0664)	U.L.Q. (<0.568)	U.L.Q. (<0.152)	1.37 ± 0.25
FATP1	3.15 ± 0.54	1.48 ± 0.00 *	1.39 ± 0.02 *	5.45 ± 1.62	4.99 ± 1.10	2.25 ± 0.10	7.60 ± 1.21	6.12 ± 0.13	1.65 ± 0.14 *
<u>Other proteins</u>									
Claudin5	U.L.Q. (<0.0904)	U.L.Q. (<0.392)	0.364 ± 0.049 *	4.02 ± 0.84	1.25 ± 0.19	0.430 ± 0.028 *	U.L.Q. (<0.367)	U.L.Q. (<0.215)	1.43 ± 0.20
JAM-A	N.D.	N.D.	N.D.	4.57 ± 0.47	2.79 ± 1.06 *	2.50 ± 0.18	1.75 ± 0.16 *	4.33 ± 0.18	31.8 ± 1.2
β-catenin	6.21 ± 0.05	5.55 ± 0.26	6.52 ± 0.20	7.08 ± 0.30	6.36 ± 0.67	7.27 ± 0.53	8.89 ± 0.94	10.3 ± 0.3	14.0 ± 0.6
PECAM1	U.L.Q. (<0.0570)	U.L.Q. (<0.0856)	U.L.Q. (<0.131)	3.09 ± 0.88 *	U.L.Q. (<0.134)	U.L.Q. (<0.0567)	N.D.	N.D.	N.Q.
γ-gtp	U.L.Q. (<0.644)	U.L.Q. (<0.284)	U.L.Q. (<0.307)	U.L.Q. (<0.0640)	U.L.Q. (<0.0648)	0.751 ± 0.062 *	U.L.Q. (<0.372)	U.L.Q. (<0.138)	7.83 ± 0.68
<u>Membrane marker proteins</u>									
Na ⁺ /K ⁺ ATPase	47.6 ± 0.8	91.2 ± 5.9	68.3 ± 2.6	23.1 ± 0.6	119 ± 4	194 ± 9	139 ± 7	116 ± 2	68.3 ± 1.1

Each value represents protein expression level in plasma membrane fraction (the mean ± S.E.M., n=2-4 SRM/MRM transitions). U.L.Q. means “under the limit of quantification” and the value in brackets following U.L.Q. represents the value of the quantification limit (fmol/μg protein). *The reliability of the calculated values is considered to be less than that of other detected molecules, because in these cases only two among four SRM/MRM transitions gave detectable peak areas over 5000 counts. N.Q.; not quantified, N.D.; not detected.

Table 3-2 Quantitative values of proteins in plasma membrane fraction of brain tumor and non-tumor brain tissues (Continued)

	Quantitative value (fmol/μg protein of plasma membrane fraction)								
	Meta7	Meta8	Meta12	Meta13	Meta14	Meta16	Meta17	Meta29	AM2
<u>Target molecules for molecular-targeted drugs</u>									
PDGFRα	U.L.Q. (<0.380)	U.L.Q. (<0.369)	U.L.Q. (<0.397)	U.L.Q. (<0.0573)	U.L.Q. (<0.0674)	U.L.Q. (<0.0643)	U.L.Q. (<0.0557)	U.L.Q. (<0.113)	U.L.Q. (<0.0300)
PDGFRβ	U.L.Q. (<0.157)	U.L.Q. (<0.162)	2.16 ± 0.18	U.L.Q. (<0.197)	U.L.Q. (<0.191)	2.15 ± 0.15	U.L.Q. (<0.784)	U.L.Q. (<0.371)	1.77 ± 0.04
EGFR	1.46 ± 0.29	1.65 ± 0.09	2.98 ± 0.21	5.22 ± 0.25	1.51 ± 0.19	2.25 ± 0.18	1.07 ± 0.07	U.L.Q. (<0.0395)	0.529 ± 0.080
ERBB2	0.856 ± 0.053	0.475 ± 0.067	4.13 ± 0.12	1.67 ± 0.15	U.L.Q. (<0.230)	U.L.Q. (<0.0282)	0.318 ± 0.102 *	104 ± 3	0.393 ± 0.076
VEGFR1	U.L.Q. (<0.168)	U.L.Q. (<0.140)	U.L.Q. (<0.175)	N.D.	N.D.	U.L.Q. (<0.959)	U.L.Q. (<2.05)	U.L.Q. (<0.0449)	U.L.Q. (<0.0732)
VEGFR2	U.L.Q. (<0.255)	U.L.Q. (<0.218)	U.L.Q. (<0.277)	U.L.Q. (<0.732)	U.L.Q. (<0.728)	U.L.Q. (<0.180)	U.L.Q. (<0.286)	U.L.Q. (<0.187)	U.L.Q. (<0.0445)
VEGFR3	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	U.L.Q. (<0.417)	N.D.
FLT3	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	U.L.Q. (<0.183)	N.D.	U.L.Q. (<0.314)	U.L.Q. (<0.701)
MET	U.L.Q. (<0.628)	U.L.Q. (<0.600)	U.L.Q. (<0.627)	U.L.Q. (<0.201)	U.L.Q. (<0.172)	U.L.Q. (<0.267)	U.L.Q. (<0.180)	U.L.Q. (<0.112)	U.L.Q. (<0.121)
IGFR	U.L.Q. (<0.289)	U.L.Q. (<0.269)	U.L.Q. (<0.278)	U.L.Q. (<0.505)	U.L.Q. (<0.503)	U.L.Q. (<0.0458)	U.L.Q. (<0.366)	U.L.Q. (<0.0802)	U.L.Q. (<0.192)
CD33	0.286 ± 0.048 *	U.L.Q. (<0.0479)	U.L.Q. (<0.122)	1.19 ± 0.03 *	U.L.Q. (<0.390)	0.187 ± 0.019 *	U.L.Q. (<0.358)	U.L.Q. (<0.136)	0.433 ± 0.002 *
CD37	0.330 ± 0.002 *	0.699 ± 0.013 *	0.477 ± 0.030 *	1.54 ± 0.15 *	U.L.Q. (<0.407)	0.142 ± 0.015 *	0.187 ± 0.003 *	0.427 ± 0.044 *	0.627 ± 0.032 *
c-kit	U.L.Q. (<0.537)	U.L.Q. (<0.525)	U.L.Q. (<0.547)	U.L.Q. (<0.254)	U.L.Q. (<0.221)	14.3 ± 0.3	U.L.Q. (<0.748)	U.L.Q. (<0.520)	U.L.Q. (<0.510)
<u>ABC transporter proteins</u>									
MDR1	0.688 ± 0.138	0.717 ± 0.172	0.983 ± 0.220	U.L.Q. (<0.0412)	U.L.Q. (<0.0580)	U.L.Q. (<0.0418)	0.445 ± 0.073 *	U.L.Q. (<0.0802)	U.L.Q. (<0.134)
MRP1	0.836 ± 0.017	0.952 ± 0.260	2.79 ± 0.24	2.01 ± 0.04	0.543 ± 0.029 *	0.300 ± 0.012 *	U.L.Q. (<0.0258)	1.19 ± 0.15	U.L.Q. (<0.0766)
MRP4	0.575 ± 0.063	0.447 ± 0.107	0.598 ± 0.125	0.554 ± 0.010	0.291 ± 0.042	0.150 ± 0.033	0.267 ± 0.053	1.08 ± 0.02	0.310 ± 0.066
BCRP	1.22 ± 0.13	0.678 ± 0.009	0.594 ± 0.125	0.776 ± 0.006 *	U.L.Q. (<0.233)	0.213 ± 0.071 *	1.13 ± 0.26	U.L.Q. (<0.0541)	U.L.Q. (<0.310)
<u>SLC transporter proteins</u>									
ASCT2	6.03 ± 0.65	2.62 ± 0.51 *	8.78 ± 0.68	3.32 ± 0.08	3.48 ± 0.28	0.813 ± 0.138	0.595 ± 0.231 *	16.0 ± 1.1	2.43 ± 0.17
GLUT1	21.4 ± 1.5	15.6 ± 1.5	9.37 ± 0.49	25.3 ± 0.6	26.5 ± 0.4	8.21 ± 0.36	9.58 ± 0.26	46.0 ± 1.3	5.19 ± 0.18
GLUT3/14	9.81 ± 0.41	14.2 ± 1.7	3.25 ± 0.53	11.3 ± 0.5	11.3 ± 0.5	0.733 ± 0.043	9.45 ± 0.13	3.14 ± 0.11	1.20 ± 0.02
MCT4	6.36 ± 0.31	3.99 ± 0.21	3.03 ± 0.11	12.2 ± 0.8	U.L.Q. (<0.719)	2.04 ± 0.24	2.18 ± 0.20	21.0 ± 1.7	0.328 ± 0.102
PEPT2	0.952 ± 0.097	0.970 ± 0.166	1.20 ± 0.29	U.L.Q. (<0.124)	0.638 ± 0.001	0.631 ± 0.104	0.776 ± 0.093	0.979 ± 0.050	U.L.Q. (<0.0956)
MCT1	2.05 ± 0.03 *	U.L.Q. (<0.732)	U.L.Q. (<0.746)	1.36 ± 0.18 *	1.45 ± 0.24 *	3.51 ± 0.24	U.L.Q. (<0.0886)	U.L.Q. (<0.0904)	U.L.Q. (<0.111)
ENT1	1.68 ± 0.09	1.36 ± 0.19	4.05 ± 0.21	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	2.24 ± 0.12	N.D.
4F2hc	10.4 ± 0.5	2.82 ± 0.20	1.34 ± 0.15	6.38 ± 0.33	4.58 ± 0.50	9.81 ± 0.12	4.94 ± 0.34	4.54 ± 0.18	3.56 ± 0.09
PCFT	1.04 ± 0.25	0.703 ± 0.121	1.10 ± 0.13	1.70 ± 0.17	U.L.Q. (<0.0470)	U.L.Q. (<0.186)	U.L.Q. (<0.205)	1.54 ± 0.49 *	U.L.Q. (<0.188)
FATP1	1.57 ± 0.09	U.L.Q. (<1.17)	1.58 ± 0.02	U.L.Q. (<0.614)	U.L.Q. (<0.626)	U.L.Q. (<0.264)	1.86 ± 0.28 *	2.22 ± 0.06	1.01 ± 0.21 *
<u>Other proteins</u>									
Claudin5	U.L.Q. (<0.650)	U.L.Q. (<0.706)	0.826 ± 0.039 *	U.L.Q. (<0.424)	0.856 ± 0.151	0.934 ± 0.008 *	U.L.Q. (<0.0944)	U.L.Q. (<0.102)	U.L.Q. (<0.0847)
JAM-A	7.66 ± 0.76	7.01 ± 0.49	28.8 ± 1.6	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	33.9 ± 2.4	N.D.
β-catenin	10.2 ± 1.2	5.90 ± 0.81	17.8 ± 2.3	11.2 ± 0.9	3.91 ± 0.19	6.18 ± 0.41	4.34 ± 0.41	5.99 ± 0.37	3.09 ± 0.13
PECAM1	N.Q.	N.Q.	N.Q.	4.89 ± 0.60	2.94 ± 0.50	5.79 ± 1.64 *	U.L.Q. (<0.0674)	N.D.	2.46 ± 0.21 *
γ-gtp	1.03 ± 0.30	1.20 ± 0.38	1.73 ± 0.28	2.59 ± 0.26	U.L.Q. (<0.332)	2.47 ± 0.12	U.L.Q. (<0.523)	2.37 ± 0.22	U.L.Q. (<0.664)
<u>Membrane marker proteins</u>									
Na ⁺ /K ⁺ ATPase	60.9 ± 4.9	77.6 ± 0.8	57.6 ± 3.6	40.2 ± 1.6	140 ± 10	23.3 ± 1.3	149 ± 9	34.2 ± 2.4	18.7 ± 0.5

Each value represents protein expression level in plasma membrane fraction (the mean ± S.E.M., n=2-4 SRM/MRM transitions). U.L.Q. means “under the limit of quantification” and the value in brackets following U.L.Q. represents the value of the quantification limit (fmol/μg protein). *The reliability of the calculated values is considered to be less than that of other detected molecules, because in these cases only two among four SRM/MRM transitions gave detectable peak areas over 5000 counts. N.Q.; not quantified, N.D.; not detected.

Table 3-2 Quantitative values of proteins in plasma membrane fraction of brain tumor and non-tumor brain tissues (Continued)

Quantitative value (fmol/μg protein of plasma membrane fraction)									
	AM4	STC1	DA27	DA28	DA34	AOA2	AA15	AA16	PNET1
<u>Target molecules for molecular-targeted drugs</u>									
PDGFR α	U.L.Q. (<0.0822)	U.L.Q. (<0.0397)	0.342 \pm 0.074 *	0.943 \pm 0.118	U.L.Q. (<0.140)	3.17 \pm 0.26	U.L.Q. (<0.0539)	U.L.Q. (<0.123)	U.L.Q. (<0.122)
PDGFR β	1.98 \pm 0.33	U.L.Q. (<0.149)	U.L.Q. (<0.512)	U.L.Q. (<0.586)	U.L.Q. (<0.447)	U.L.Q. (<0.697)	U.L.Q. (<0.394)	U.L.Q. (<0.120)	U.L.Q. (<0.599)
EGFR	0.725 \pm 0.018	U.L.Q. (<0.0439)	1.56 \pm 0.22	6.75 \pm 0.72	4.10 \pm 0.33	13.4 \pm 0.8	U.L.Q. (<0.0447)	4.27 \pm 0.12	4.74 \pm 0.92
ERBB2	0.806 \pm 0.151	0.376 \pm 0.015 *	U.L.Q. (<0.108)	U.L.Q. (<0.112)	U.L.Q. (<0.0323)	U.L.Q. (<0.119)	U.L.Q. (<0.315)	U.L.Q. (<0.0561)	U.L.Q. (<0.111)
VEGFR1	1.08 \pm 0.07 *	U.L.Q. (<0.192)	U.L.Q. (<0.0886)	U.L.Q. (<0.127)	0.647 \pm 0.002 *	U.L.Q. (<0.134)	U.L.Q. (<0.108)	0.218 \pm 0.064	U.L.Q. (<0.145)
VEGFR2	U.L.Q. (<0.175)	U.L.Q. (<0.787)	U.L.Q. (<0.639)	U.L.Q. (<0.775)	U.L.Q. (<0.722)	U.L.Q. (<0.898)	U.L.Q. (<0.874)	U.L.Q. (<0.152)	U.L.Q. (<0.645)
VEGFR3	N.D.	U.L.Q. (<0.258)	U.L.Q. (<0.587)	U.L.Q. (<0.751)	U.L.Q. (<0.328)	U.L.Q. (<0.715)	U.L.Q. (<0.114)	1.30 \pm 0.25	U.L.Q. (<0.704)
FLT3	U.L.Q. (<0.137)	U.L.Q. (<0.220)	U.L.Q. (<0.271)	U.L.Q. (<0.255)	U.L.Q. (<0.183)	U.L.Q. (<0.322)	U.L.Q. (<0.391)	U.L.Q. (<0.188)	U.L.Q. (<0.205)
MET	U.L.Q. (<0.197)	U.L.Q. (<0.551)	U.L.Q. (<0.532)	U.L.Q. (<0.370)	U.L.Q. (<0.934)	U.L.Q. (<0.656)	U.L.Q. (<2.50)	U.L.Q. (<0.220)	U.L.Q. (<0.313)
IGFR	U.L.Q. (<0.0372)	U.L.Q. (<0.0862)	U.L.Q. (<0.130)	U.L.Q. (<0.176)	U.L.Q. (<0.146)	U.L.Q. (<0.209)	U.L.Q. (<0.0959)	U.L.Q. (<0.0413)	U.L.Q. (<0.181)
CD33	U.L.Q. (<0.0476)	U.L.Q. (<0.176)	U.L.Q. (<0.0495)	U.L.Q. (<0.159)	U.L.Q. (<0.111)	U.L.Q. (<0.0582)	0.787 \pm 0.035 *	U.L.Q. (<0.109)	U.L.Q. (<0.0474)
CD37	0.350 \pm 0.125	U.L.Q. (<0.0498)	U.L.Q. (<0.0987)	0.226 \pm 0.017 *	0.354 \pm 0.006 *	U.L.Q. (<0.104)	0.609 \pm 0.113 *	0.201 \pm 0.048 *	U.L.Q. (<0.0893)
c-kit	0.921 \pm 0.116	U.L.Q. (<0.233)	U.L.Q. (<0.111)	U.L.Q. (<0.206)	5.75 \pm 0.98	U.L.Q. (<0.299)	U.L.Q. (<0.664)	4.22 \pm 0.51	6.87 \pm 2.61
<u>ABC transporter proteins</u>									
MDR1	0.321 \pm 0.055	0.684 \pm 0.047	U.L.Q. (<0.169)	1.12 \pm 0.11	2.13 \pm 0.06	U.L.Q. (<0.162)	U.L.Q. (<0.152)	1.18 \pm 0.08	U.L.Q. (<0.127)
MRP1	1.47 \pm 0.19	1.47 \pm 0.09	U.L.Q. (<0.185)	0.357 \pm 0.062 *	U.L.Q. (<0.100)	0.270 \pm 0.007 *	0.448 \pm 0.095 *	0.267 \pm 0.036 *	0.909 \pm 0.079
MRP4	0.563 \pm 0.013	1.01 \pm 0.04	U.L.Q. (<0.164)	0.461 \pm 0.101 *	1.01 \pm 0.02	0.555 \pm 0.077	U.L.Q. (<0.436)	0.855 \pm 0.059	0.628 \pm 0.101
BCRP	0.512 \pm 0.067	U.L.Q. (<0.266)	U.L.Q. (<0.597)	3.89 \pm 0.34	7.02 \pm 0.44	5.76 \pm 0.69	U.L.Q. (<0.529)	2.56 \pm 0.12	1.74 \pm 0.27
<u>SLC transporter proteins</u>									
ASCT2	0.952 \pm 0.104	1.70 \pm 0.15 *	U.L.Q. (<0.169)	U.L.Q. (<0.621)	U.L.Q. (<0.362)	U.L.Q. (<0.667)	U.L.Q. (<0.499)	U.L.Q. (<0.365)	2.94 \pm 0.18
GLUT1	8.14 \pm 0.43	18.8 \pm 1.1	4.02 \pm 0.57	23.1 \pm 1.2	21.6 \pm 0.4	35.5 \pm 2.1	16.9 \pm 0.8	59.3 \pm 1.6	24.6 \pm 1.2
GLUT3/14	1.94 \pm 0.20	4.00 \pm 0.22	11.9 \pm 0.4	10.7 \pm 0.4	1.96 \pm 0.09	2.21 \pm 0.08	3.02 \pm 0.12	7.83 \pm 0.41	7.11 \pm 0.30
MCT4	3.03 \pm 0.23	U.L.Q. (<0.131)	U.L.Q. (<1.133)	U.L.Q. (<0.751)	U.L.Q. (<0.232)	U.L.Q. (<1.30)	U.L.Q. (<0.738)	U.L.Q. (<0.0940)	U.L.Q. (<0.670)
PEPT2	U.L.Q. (<0.142)	U.L.Q. (<0.107)	0.873 \pm 0.086	3.38 \pm 0.16	6.50 \pm 0.13	U.L.Q. (<0.434)	U.L.Q. (<0.354)	1.10 \pm 0.06	U.L.Q. (<0.205)
MCT1	1.35 \pm 0.25 *	2.80 \pm 0.36	U.L.Q. (<0.204)	2.97 \pm 0.20	5.88 \pm 0.20	U.L.Q. (<0.368)	U.L.Q. (<1.59)	2.37 \pm 0.21	4.19 \pm 0.57
ENT1	N.D.	2.22 \pm 0.46 *	U.L.Q. (<2.11)	U.L.Q. (<0.363)	0.681 \pm 0.089 *	U.L.Q. (<2.35)	U.L.Q. (<2.41)	1.50 \pm 0.13	3.47 \pm 0.93 *
4F2hc	2.90 \pm 0.17	3.49 \pm 0.33	2.59 \pm 0.24	4.46 \pm 0.38	3.27 \pm 0.15	6.66 \pm 1.00	3.65 \pm 0.54	2.63 \pm 0.29	6.93 \pm 0.50
PCFT	U.L.Q. (<0.212)	U.L.Q. (<0.142)	U.L.Q. (<0.352)	U.L.Q. (<0.544)	U.L.Q. (<0.190)	U.L.Q. (<0.523)	U.L.Q. (<0.561)	U.L.Q. (<0.0805)	U.L.Q. (<0.375)
FATP1	1.41 \pm 0.27 *	U.L.Q. (<0.0921)	2.47 \pm 0.04 *	2.66 \pm 0.18	6.20 \pm 0.21	U.L.Q. (<0.210)	3.65 \pm 0.49	2.05 \pm 0.22	U.L.Q. (<0.154)
<u>Other proteins</u>									
Claudin5	4.07 \pm 0.20	2.33 \pm 0.13	U.L.Q. (<0.132)	0.954 \pm 0.038 *	U.L.Q. (<0.258)	1.65 \pm 0.07 *	U.L.Q. (<0.149)	0.906 \pm 0.203 *	2.03 \pm 0.49
JAM-A	N.D.	19.8 \pm 2.1	U.L.Q. (<0.154)	2.99 \pm 0.30	2.64 \pm 0.28	1.42 \pm 0.25 *	3.33 \pm 0.44 *	2.94 \pm 0.39	5.74 \pm 0.73
β -catenin	9.39 \pm 1.32	16.0 \pm 0.9	4.16 \pm 0.94	8.17 \pm 0.19	9.34 \pm 0.31	5.45 \pm 0.15	8.78 \pm 0.14	7.70 \pm 0.59	7.66 \pm 0.97
PECAM1	3.65 \pm 0.21	2.10 \pm 0.74 *	U.L.Q. (<0.320)	U.L.Q. (<0.402)	N.D.	U.L.Q. (<0.389)	1.91 \pm 0.09 *	U.L.Q. (<0.0499)	5.67 \pm 0.93
γ -gtp	0.491 \pm 0.054	U.L.Q. (<0.0690)	U.L.Q. (<0.445)	U.L.Q. (<0.629)	U.L.Q. (<0.249)	U.L.Q. (<0.652)	U.L.Q. (<0.615)	U.L.Q. (<0.107)	U.L.Q. (<0.588)
<u>Membrane marker proteins</u>									
Na ⁺ /K ⁺ ATPase	64.0 \pm 0.9	55.1 \pm 2.5	257 \pm 11	142 \pm 4	105 \pm 3	49.5 \pm 3.6	116 \pm 8	133 \pm 6	141 \pm 5

Each value represents protein expression level in plasma membrane fraction (the mean \pm S.E.M., n=2-4 SRM/MRM transitions). U.L.Q. means “under the limit of quantification” and the value in brackets following U.L.Q. represents the value of the quantification limit (fmol/μg protein). *The reliability of the calculated values is considered to be less than that of other detected molecules, because in these cases only two among four SRM/MRM transitions gave detectable peak areas over 5000 counts. N.Q.; not quantified, N.D.; not detected.

Table 3-2 Quantitative values of proteins in plasma membrane fraction of brain tumor and non-tumor brain tissues (Continued)

		Quantitative value (fmol/μg protein of plasma membrane fraction)								
PA		PA3	PXA20121023	ML	ABS111174161	ABS352JK00909	ABS2467970101	NB40	NB41	
<u>Target molecules for molecular-targeted drugs</u>										
PDGFRα	U.L.Q. (<0.128)	2.73 ± 0.56	U.L.Q. (<0.123)	U.L.Q. (<0.0510)	U.L.Q. (<0.0588)	U.L.Q. (<0.0159)	U.L.Q. (<0.0131)	U.L.Q. (<0.0134)	U.L.Q. (<0.0103)	
PDGFRβ	U.L.Q. (<0.401)	U.L.Q. (<0.415)	U.L.Q. (<0.335)	U.L.Q. (<0.431)	U.L.Q. (<0.158)	U.L.Q. (<0.104)	U.L.Q. (<0.0973)	U.L.Q. (<0.0856)	U.L.Q. (<0.199)	
EGFR	U.L.Q. (<0.0620)	1.21 ± 0.05	3.54 ± 0.10	U.L.Q. (<0.0810)	U.L.Q. (<0.0972)	0.675 ± 0.090 *	0.592 ± 0.028	0.613 ± 0.077 *	0.573 ± 0.157 *	
ERBB2	U.L.Q. (<0.0885)	U.L.Q. (<0.0637)	U.L.Q. (<0.0639)	U.L.Q. (<0.102)	U.L.Q. (<0.219)	U.L.Q. (<0.0336)	U.L.Q. (<0.0347)	U.L.Q. (<0.0338)	U.L.Q. (<0.0358)	
VEGFR1	U.L.Q. (<0.0930)	U.L.Q. (<0.0771)	U.L.Q. (<0.0688)	U.L.Q. (<0.121)	N.D.	U.L.Q. (<0.0325)	U.L.Q. (<0.0427)	U.L.Q. (<0.0463)	U.L.Q. (<0.0719)	
VEGFR2	U.L.Q. (<0.766)	U.L.Q. (<0.200)	U.L.Q. (<0.268)	U.L.Q. (<0.885)	U.L.Q. (<0.735)	U.L.Q. (<0.303)	U.L.Q. (<0.191)	U.L.Q. (<0.286)	U.L.Q. (<0.318)	
VEGFR3	U.L.Q. (<0.142)	2.23 ± 0.33	U.L.Q. (<0.484)	U.L.Q. (<0.157)	N.D.	U.L.Q. (<0.0490)	U.L.Q. (<0.0539)	U.L.Q. (<0.0261)	U.L.Q. (<0.0958)	
FLT3	U.L.Q. (<0.412)	U.L.Q. (<0.387)	U.L.Q. (<0.364)	U.L.Q. (<0.360)	N.D.	U.L.Q. (<0.289)	U.L.Q. (<0.0817)	U.L.Q. (<0.308)	U.L.Q. (<0.259)	
MET	U.L.Q. (<3.06)	U.L.Q. (<0.173)	U.L.Q. (<0.172)	U.L.Q. (<2.70)	U.L.Q. (<0.183)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	
IGFR	U.L.Q. (<0.0963)	U.L.Q. (<0.0932)	U.L.Q. (<0.0904)	U.L.Q. (<0.109)	U.L.Q. (<0.486)	U.L.Q. (<0.0374)	U.L.Q. (<0.0325)	U.L.Q. (<0.0325)	U.L.Q. (<0.0265)	
CD33	U.L.Q. (<0.119)	U.L.Q. (<0.151)	1.28 ± 0.10 *	1.18 ± 0.06 *	U.L.Q. (<0.105)	U.L.Q. (<0.0986)	U.L.Q. (<0.0841)	U.L.Q. (<0.0891)	U.L.Q. (<0.0890)	
CD37	U.L.Q. (<0.169)	0.298 ± 0.021 *	1.01 ± 0.06 *	66.8 ± 5.3	U.L.Q. (<0.407)	U.L.Q. (<0.127)	U.L.Q. (<0.119)	U.L.Q. (<0.108)	U.L.Q. (<0.166)	
c-kit	U.L.Q. (<0.374)	4.85 ± 0.61	U.L.Q. (<0.546)	U.L.Q. (<0.103)	U.L.Q. (<0.261)	U.L.Q. (<0.0856)	U.L.Q. (<0.107)	U.L.Q. (<0.137)	U.L.Q. (<0.0633)	
<u>ABC transporter proteins</u>										
MDR1	U.L.Q. (<0.145)	U.L.Q. (<0.0987)	U.L.Q. (<0.102)	U.L.Q. (<0.150)	U.L.Q. (<0.0604)	0.226 ± 0.032 *	0.119 ± 0.010 *	U.L.Q. (<0.196)	U.L.Q. (<0.250)	
MRP1	0.813 ± 0.162 *	U.L.Q. (<0.116)	1.31 ± 0.09	4.62 ± 0.47	U.L.Q. (<0.0445)	U.L.Q. (<0.0342)	U.L.Q. (<0.0331)	U.L.Q. (<0.0338)	U.L.Q. (<0.0275)	
MRP4	U.L.Q. (<0.345)	0.467 ± 0.036	0.545 ± 0.042	0.744 ± 0.105	0.200 ± 0.038 *	U.L.Q. (<0.0862)	U.L.Q. (<0.0975)	U.L.Q. (<0.0862)	0.198 ± 0.024 *	
BCRP	U.L.Q. (<0.906)	1.96 ± 0.03	1.66 ± 0.11	U.L.Q. (<0.479)	U.L.Q. (<0.234)	0.405 ± 0.042	N.D.	U.L.Q. (<0.159)	U.L.Q. (<0.161)	
<u>SLC transporter proteins</u>										
ASCT2	U.L.Q. (<0.632)	U.L.Q. (<0.162)	5.41 ± 0.46	9.19 ± 0.66	U.L.Q. (<0.0604)	U.L.Q. (<0.0236)	U.L.Q. (<0.0246)	U.L.Q. (<0.0246)	U.L.Q. (<0.0231)	
GLUT1	14.4 ± 0.8	17.3 ± 0.6	9.99 ± 0.58	20.7 ± 0.5	2.17 ± 0.20	2.40 ± 0.15	1.59 ± 0.08	2.62 ± 0.06	5.51 ± 0.23	
GLUT3/14	3.16 ± 0.28	5.20 ± 0.20	6.57 ± 0.24	3.51 ± 0.34	9.07 ± 0.26	8.18 ± 0.17	N.D.	10.9 ± 0.5	5.34 ± 0.59	
MCT4	U.L.Q. (<1.58)	1.53 ± 0.08 *	5.22 ± 0.71	3.73 ± 0.16 *	U.L.Q. (<0.736)	U.L.Q. (<0.0267)	N.D.	U.L.Q. (<0.0604)	U.L.Q. (<0.142)	
PEPT2	U.L.Q. (<0.316)	0.658 ± 0.001 *	U.L.Q. (<0.110)	U.L.Q. (<0.358)	1.08 ± 0.07	0.575 ± 0.117	0.356 ± 0.092 *	0.588 ± 0.091	U.L.Q. (<0.0835)	
MCT1	U.L.Q. (<0.219)	2.04 ± 0.11	U.L.Q. (<0.0797)	U.L.Q. (<1.89)	U.L.Q. (<0.199)	0.740 ± 0.165 *	0.615 ± 0.090 *	1.04 ± 0.38	1.14 ± 0.12	
ENT1	5.10 ± 0.73	1.57 ± 0.21	1.91 ± 0.10	11.3 ± 1.1	N.D.	0.610 ± 0.085 *	0.606 ± 0.209 *	U.L.Q. (<0.359)	0.544 ± 0.161 *	
4F2hc	U.L.Q. (<0.160)	2.47 ± 0.20	2.52 ± 0.34	7.04 ± 0.31	3.71 ± 0.29	3.82 ± 0.63	3.21 ± 0.15	3.79 ± 0.48	2.50 ± 0.28	
PCFT	U.L.Q. (<0.383)	U.L.Q. (<0.224)	U.L.Q. (<0.200)	U.L.Q. (<0.394)	U.L.Q. (<0.0889)	U.L.Q. (<0.0437)	U.L.Q. (<0.0506)	U.L.Q. (<0.0816)	U.L.Q. (<0.0833)	
FATP1	U.L.Q. (<0.178)	4.72 ± 0.61	3.71 ± 0.63	3.01 ± 0.69	U.L.Q. (<0.625)	2.36 ± 0.32 *	U.L.Q. (<0.166)	2.33 ± 0.25 *	2.13 ± 0.22	
<u>Other proteins</u>										
Claudin5	U.L.Q. (<0.135)	U.L.Q. (<0.143)	U.L.Q. (<0.124)	U.L.Q. (<0.271)	U.L.Q. (<0.424)	U.L.Q. (<0.649)	U.L.Q. (<0.462)	U.L.Q. (<0.227)	U.L.Q. (<0.495)	
JAM-A	16.7 ± 1.6	3.53 ± 0.19	4.18 ± 0.23	6.15 ± 0.99	N.D.	U.L.Q. (<0.350)	U.L.Q. (<0.243)	N.D.	U.L.Q. (<0.347)	
β-catenin	8.39 ± 1.09	12.2 ± 0.8	1.74 ± 0.10	1.96 ± 0.21 *	2.82 ± 0.18	2.19 ± 0.40 *	2.65 ± 0.35	4.75 ± 0.51	5.58 ± 0.62	
PECAM1	1.81 ± 0.19 *	N.D.	N.D.	6.48 ± 1.42	U.L.Q. (<0.0349)	U.L.Q. (<0.0718)	U.L.Q. (<0.0611)	U.L.Q. (<0.0720)	U.L.Q. (<0.0756)	
γ-gtp	U.L.Q. (<0.598)	U.L.Q. (<0.202)	U.L.Q. (<0.207)	2.42 ± 0.39	U.L.Q. (<0.125)	0.261 ± 0.050 *	0.312 ± 0.109 *	U.L.Q. (<0.198)	U.L.Q. (<0.272)	
<u>Membrane marker proteins</u>										
Na ⁺ /K ⁺ ATPase	137 ± 10	83.9 ± 2.7	34.2 ± 2.1	81.7 ± 9.9	137 ± 10	199 ± 8	158 ± 3	215 ± 14	119 ± 10	

Each value represents protein expression level in plasma membrane fraction (the mean ± S.E.M., n=2-4 SRM/MRM transitions). U.L.Q. means “under the limit of quantification” and the value in brackets following U.L.Q. represents the value of the quantification limit (fmol/μg protein). *The reliability of the calculated values is considered to be less than that of other detected molecules, because in these cases only two among four SRM/MRM transitions gave detectable peak areas over 5000 counts. N.Q.; not quantified, N.D.; not detected.

Table 3-2 Quantitative values of proteins in plasma membrane fraction of brain tumor and non-tumor brain tissues (Continued)

	Quantitative value (fmol/μg protein of plasma membrane fraction)						
	NB43	NB44	GBM99/Normal	GBM115/Normal	GBM125/Normal	GBM137/Normal	GBM138/Normal
<u>Target molecules for molecular-targeted drugs</u>							
PDGFRα	U.L.Q. (<0.123)	U.L.Q. (<0.0112)	U.L.Q. (<0.0218)	U.L.Q. (<0.0410)	U.L.Q. (<0.132)	U.L.Q. (<0.139)	U.L.Q. (<0.129)
PDGFRβ	U.L.Q. (<0.566)	U.L.Q. (<0.0634)	U.L.Q. (<0.0755)	U.L.Q. (<0.149)	U.L.Q. (<0.440)	U.L.Q. (<0.425)	U.L.Q. (<0.372)
EGFR	0.961 ± 0.059 *	0.600 ± 0.000 *	0.487 ± 0.083 *	0.689 ± 0.128	1.20 ± 0.14	1.06 ± 0.10 *	U.L.Q. (<0.207)
ERBB2	U.L.Q. (<0.150)	U.L.Q. (<0.0377)	U.L.Q. (<0.0371)	U.L.Q. (<0.596)	U.L.Q. (<0.0695)	U.L.Q. (<0.0335)	U.L.Q. (<0.0322)
VEGFR1	U.L.Q. (<0.117)	U.L.Q. (<0.0581)	U.L.Q. (<0.0508)	U.L.Q. (<0.0952)	U.L.Q. (<0.0766)	U.L.Q. (<0.142)	U.L.Q. (<0.140)
VEGFR2	U.L.Q. (<0.670)	U.L.Q. (<0.234)	U.L.Q. (<0.297)	U.L.Q. (<0.0785)	U.L.Q. (<0.254)	U.L.Q. (<0.751)	U.L.Q. (<0.748)
VEGFR3	U.L.Q. (<0.648)	U.L.Q. (<0.0152)	U.L.Q. (<0.0573)	U.L.Q. (<0.184)	U.L.Q. (<0.413)	U.L.Q. (<0.545)	U.L.Q. (<0.322)
FLT3	U.L.Q. (<0.335)	U.L.Q. (<0.362)	U.L.Q. (<0.362)	U.L.Q. (<0.232)	U.L.Q. (<0.371)	U.L.Q. (<0.196)	U.L.Q. (<0.208)
MET	U.L.Q. (<0.618)	N.D.	N.D.	U.L.Q. (<0.223)	U.L.Q. (<0.147)	U.L.Q. (<0.880)	U.L.Q. (<0.919)
IGFR	U.L.Q. (<0.117)	U.L.Q. (<0.0369)	U.L.Q. (<0.0319)	U.L.Q. (<0.112)	U.L.Q. (<0.108)	U.L.Q. (<0.164)	U.L.Q. (<0.163)
CD33	U.L.Q. (<0.145)	U.L.Q. (<0.0958)	U.L.Q. (<0.0958)	U.L.Q. (<0.149)	U.L.Q. (<0.140)	U.L.Q. (<0.109)	U.L.Q. (<0.0907)
CD37	0.239 ± 0.011 *	U.L.Q. (<0.154)	U.L.Q. (<0.136)	0.095 ± 0.018 *	U.L.Q. (<0.0394)	U.L.Q. (<0.0885)	0.214 ± 0.003 *
c-kit	U.L.Q. (<0.0995)	U.L.Q. (<0.194)	U.L.Q. (<0.0577)	U.L.Q. (<0.254)	U.L.Q. (<0.572)	U.L.Q. (<0.235)	U.L.Q. (<0.119)
<u>ABC transporter proteins</u>							
MDR1	U.L.Q. (<0.193)	U.L.Q. (<0.249)	U.L.Q. (<0.248)	0.172 ± 0.081 *	U.L.Q. (<0.0848)	U.L.Q. (<0.0871)	U.L.Q. (<0.0942)
MRP1	U.L.Q. (<0.241)	U.L.Q. (<0.0361)	U.L.Q. (<0.0363)	U.L.Q. (<0.161)	U.L.Q. (<0.123)	U.L.Q. (<0.0970)	U.L.Q. (<0.0997)
MRP4	U.L.Q. (<0.259)	U.L.Q. (<0.0828)	U.L.Q. (<0.105)	0.487 ± 0.037	0.398 ± 0.058	0.144 ± 0.032	0.266 ± 0.020
BCRP	U.L.Q. (<0.921)	U.L.Q. (<0.120)	U.L.Q. (<0.146)	0.354 ± 0.034	U.L.Q. (<0.0660)	0.665 ± 0.124 *	U.L.Q. (<0.114)
<u>SLC transporter proteins</u>							
ASCT2	U.L.Q. (<0.589)	U.L.Q. (<0.0235)	U.L.Q. (<0.0255)	U.L.Q. (<0.365)	U.L.Q. (<0.0435)	U.L.Q. (<0.331)	U.L.Q. (<0.385)
GLUT1	7.87 ± 1.33	4.93 ± 0.40	3.48 ± 0.21	1.93 ± 0.11	1.64 ± 0.12	4.40 ± 0.56	6.07 ± 0.21
GLUT3/14	16.0 ± 0.5	N.D.	16.9 ± 0.7	1.38 ± 0.04	1.87 ± 0.06	10.8 ± 0.3	2.62 ± 0.17
MCT4	U.L.Q. (<1.14)	U.L.Q. (<0.447)	U.L.Q. (<0.246)	U.L.Q. (<0.114)	U.L.Q. (<0.0920)	U.L.Q. (<0.196)	U.L.Q. (<0.204)
PEPT2	U.L.Q. (<0.537)	1.16 ± 0.21	0.828 ± 0.092	0.730 ± 0.037	0.684 ± 0.058	2.31 ± 0.10	U.L.Q. (<0.0827)
MCT1	U.L.Q. (<0.286)	U.L.Q. (<0.166)	U.L.Q. (<0.187)	2.08 ± 0.08	1.77 ± 0.10	U.L.Q. (<0.612)	1.57 ± 0.27
ENT1	0.958 ± 0.322 *	0.798 ± 0.133 *	0.848 ± 0.223 *	U.L.Q. (<0.0550)	U.L.Q. (<0.227)	0.683 ± 0.074 *	U.L.Q. (<0.233)
4F2hc	4.08 ± 0.28	3.85 ± 0.29	4.43 ± 0.70	3.45 ± 0.64	2.50 ± 0.14	1.80 ± 0.13	1.11 ± 0.02 *
PCFT	U.L.Q. (<0.512)	U.L.Q. (<0.0867)	U.L.Q. (<0.104)	U.L.Q. (<0.0697)	U.L.Q. (<0.220)	U.L.Q. (<0.140)	U.L.Q. (<0.147)
FATP1	U.L.Q. (<0.239)	1.38 ± 0.55 *	3.14 ± 0.84	2.59 ± 0.10	2.50 ± 0.40	3.66 ± 0.67	4.32 ± 0.44
<u>Other proteins</u>							
Claudin5	0.461 ± 0.069 *	U.L.Q. (<0.832)	U.L.Q. (<0.952)	U.L.Q. (<0.135)	U.L.Q. (<0.144)	U.L.Q. (<0.274)	U.L.Q. (<0.263)
JAM-A	U.L.Q. (<1.02)	U.L.Q. (<0.479)	U.L.Q. (<0.367)	1.45 ± 0.06	U.L.Q. (<0.605)	U.L.Q. (<0.667)	U.L.Q. (<0.912)
β-catenin	5.04 ± 0.65	4.67 ± 0.89	4.60 ± 0.37	7.19 ± 0.55	5.21 ± 0.49	7.17 ± 0.51	5.16 ± 0.06
PECAM1	U.L.Q. (<0.374)	U.L.Q. (<0.0836)	U.L.Q. (<0.0790)	U.L.Q. (<0.0345)	N.D.	N.D.	N.D.
γ-gtp	U.L.Q. (<0.535)	U.L.Q. (<0.186)	U.L.Q. (<0.205)	U.L.Q. (<0.0530)	U.L.Q. (<0.160)	U.L.Q. (<0.197)	U.L.Q. (<0.195)
<u>Membrane marker proteins</u>							
Na ⁺ /K ⁺ ATPase	210 ± 14	213 ± 9	201 ± 16	93.0 ± 5.0	83.5 ± 4.7	242 ± 9	164 ± 9

Each value represents protein expression level in plasma membrane fraction (the mean ± S.E.M., n=2-4 SRM/MRM transitions). U.L.Q. means “under the limit of quantification” and the value in brackets following U.L.Q. represents the value of the quantification limit (fmol/μg protein). *The reliability of the calculated values is considered to be less than that of other detected molecules, because in these cases only two among four SRM/MRM transitions gave detectable peak areas over 5000 counts. N.Q.; not quantified, N.D.; not detected.

Table 3-3 Summary of membrane proteins expressions in plasma membrane fraction of GBM tissues and all brain tumor tissues

Quantitative value of membrane protein (fmol/μg protein)														
	GBM (including recurrent GBM)							All brain tumor						
	n	Mean	S.D.	Median	Max	Min	Positive %	n	Mean	S.D.	Median	Max	Min	Positive %
<u>Target molecules for molecular-targeted drugs</u>														
PDGFRα	58	2.21	5.18	U.L.Q.	26.1	U.L.Q.	37.9 (22/58)	85	1.59	4.39	U.L.Q.	26.1	U.L.Q.	30.6 (26/85)
PDGFRβ	55	0.190	0.780	U.L.Q.	4.76	U.L.Q.	7.27 (4/55)	82	0.226	0.762	U.L.Q.	4.76	U.L.Q.	9.76 (8/82)
EGFR	56	18.6	34.9	3.86	143	U.L.Q.	85.7 (48/56)	83	13.5	29.6	3.32	143	U.L.Q.	84.3 (70/83)
ERBB2	58	0.238	0.483	U.L.Q.	2.43	U.L.Q.	31.0 (18/58)	85	1.51	11.22	U.L.Q.	104	U.L.Q.	32.9 (28/85)
VEGFR1	53	0.305	0.964	U.L.Q.	4.09	U.L.Q.	11.3 (6/53)	78	0.232	0.812	U.L.Q.	4.09	U.L.Q.	11.5 (9/78)
VEGFR2	55	U.L.Q.	-	-	-	-	0 (0/55)	82	U.L.Q.	-	-	-	-	0 (0/82)
VEGFR3	31	U.L.Q.	-	-	-	-	0 (0/31)	48	0.0736	0.3695	U.L.Q.	2.23	U.L.Q.	4.17 (2/48)
FLT3	34	0.0318	0.1854	U.L.Q.	1.08	U.L.Q.	2.94 (1/34)	54	0.0200	0.1471	U.L.Q.	1.08	U.L.Q.	1.85 (1/54)
MET	50	0.352	2.490	U.L.Q.	17.6	U.L.Q.	2.00 (1/50)	77	0.229	2.006	U.L.Q.	17.6	U.L.Q.	1.30 (1/77)
IGFR	55	0.0162	0.0841	U.L.Q.	0.463	U.L.Q.	3.64 (2/55)	82	0.0108	0.0691	U.L.Q.	0.463	U.L.Q.	2.44 (2/82)
CD33	55	0.103	0.254	U.L.Q.	1.37	U.L.Q.	21.8 (12/55)	82	0.134	0.313	U.L.Q.	1.37	U.L.Q.	23.2 (19/82)
CD37	55	0.286	0.256	0.306	1.29	U.L.Q.	72.7 (40/55)	82	1.11	7.34	0.301	66.8	U.L.Q.	70.7 (58/82)
c-kit	55	0.509	1.860	U.L.Q.	9.97	U.L.Q.	10.9 (6/55)	82	0.807	2.425	U.L.Q.	14.3	U.L.Q.	15.9 (13/82)
<u>ABC transporter proteins</u>														
MDR1	58	0.374	0.364	U.L.Q.	1.18	U.L.Q.	60.3 (35/58)	85	0.394	0.431	0.377	2.13	U.L.Q.	57.6 (49/85)
MRP1	56	0.492	0.503	U.L.Q.	2.52	U.L.Q.	76.8 (43/56)	83	0.614	0.756	0.445	4.62	U.L.Q.	75.9 (63/83)
MRP4	58	0.495	0.204	U.L.Q.	1.04	U.L.Q.	94.8 (55/58)	85	0.505	0.237	0.497	1.08	U.L.Q.	92.9 (79/85)
BCRP	58	1.15	0.96	0.975	3.89	U.L.Q.	81.0 (47/58)	85	1.24	1.30	0.962	7.02	U.L.Q.	77.6 (66/85)
<u>SLC transporter proteins</u>														
ASCT2	58	0.307	0.658	U.L.Q.	2.36	U.L.Q.	22.4 (13/58)	85	1.02	2.42	U.L.Q.	16.0	U.L.Q.	32.9 (28/85)
GLUT1	58	31.3	49.3	20.1	316	2.80	100 (58/58)	85	28.7	41.9	19.5	316	2.80	100 (85/85)
GLUT3/14	58	6.09	3.35	5.86	16.3	1.63	100 (58/58)	84	6.21	3.63	5.86	16.3	0.733	100 (84/84)
MCT4	58	1.48	1.66	1.20	7.13	U.L.Q.	62.1 (36/58)	85	1.91	3.16	1.13	21.0	U.L.Q.	57.6 (49/85)
PEPT2	58	1.03	1.03	0.910	6.34	U.L.Q.	79.3 (46/58)	85	1.01	1.18	0.843	6.50	U.L.Q.	71.8 (61/85)
MCT1	58	3.10	2.31	2.69	11.6	U.L.Q.	87.9 (51/58)	85	2.56	2.24	2.26	11.6	U.L.Q.	77.6 (66/85)
ENT1	42	1.05	1.09	0.950	6.07	U.L.Q.	73.8 (31/42)	63	1.46	1.76	1.12	11.3	U.L.Q.	76.2 (48/63)
4F2hc	58	3.23	1.22	3.13	6.39	0.613	100 (58/58)	85	3.59	1.74	3.27	10.4	U.L.Q.	98.8 (84/85)
PCFT	58	0.155	0.391	U.L.Q.	1.66	U.L.Q.	15.5 (9/58)	85	0.211	0.470	U.L.Q.	1.70	U.L.Q.	18.8 (16/85)
FATP1	58	3.21	1.88	3.11	7.64	U.L.Q.	87.9 (51/58)	85	2.90	2.00	2.85	7.64	U.L.Q.	82.4 (70/85)
<u>Other proteins</u>														
Claudin5	58	0.328	0.519	U.L.Q.	2.12	U.L.Q.	34.5 (20/58)	85	0.479	0.808	U.L.Q.	4.07	U.L.Q.	38.8 (33/85)
JAM-A	37	3.36	2.06	3.07	10.2	U.L.Q.	97.3 (36/37)	58	5.42	7.01	3.25	33.9	U.L.Q.	96.6 (56/58)
β-catenin	58	7.41	3.18	6.93	19.0	0.964	100 (58/58)	85	7.56	3.42	7.21	19.0	0.964	100 (85/85)
PECAM1	34	1.27	1.64	U.L.Q.	5.67	U.L.Q.	47.1 (16/34)	52	1.61	1.93	1.12	6.48	U.L.Q.	51.9 (27/52)
γ-gtp	58	0.341	0.551	U.L.Q.	2.29	U.L.Q.	32.8 (19/58)	85	0.502	1.061	U.L.Q.	7.83	U.L.Q.	34.1 (29/85)
<u>Membrane marker proteins</u>														
Na ⁺ /K ⁺ ATPase	56	80.3	37.2	75.7	250	20.7	100 (56/56)	83	84.8	45.0	77.6	257	18.7	100 (83/83)

Plasma membrane fraction of GBM tissues and other brain tumor tissues were analyzed by multiplexed-SRM/MRM analysis using LC-MS/MS. Each value represents protein expression level in plasma membrane fraction. U.L.Q. means “under the limit of quantification.” Max: Maximum expression level among tumor tissues, Min: Minimum expression level among tumor tissues

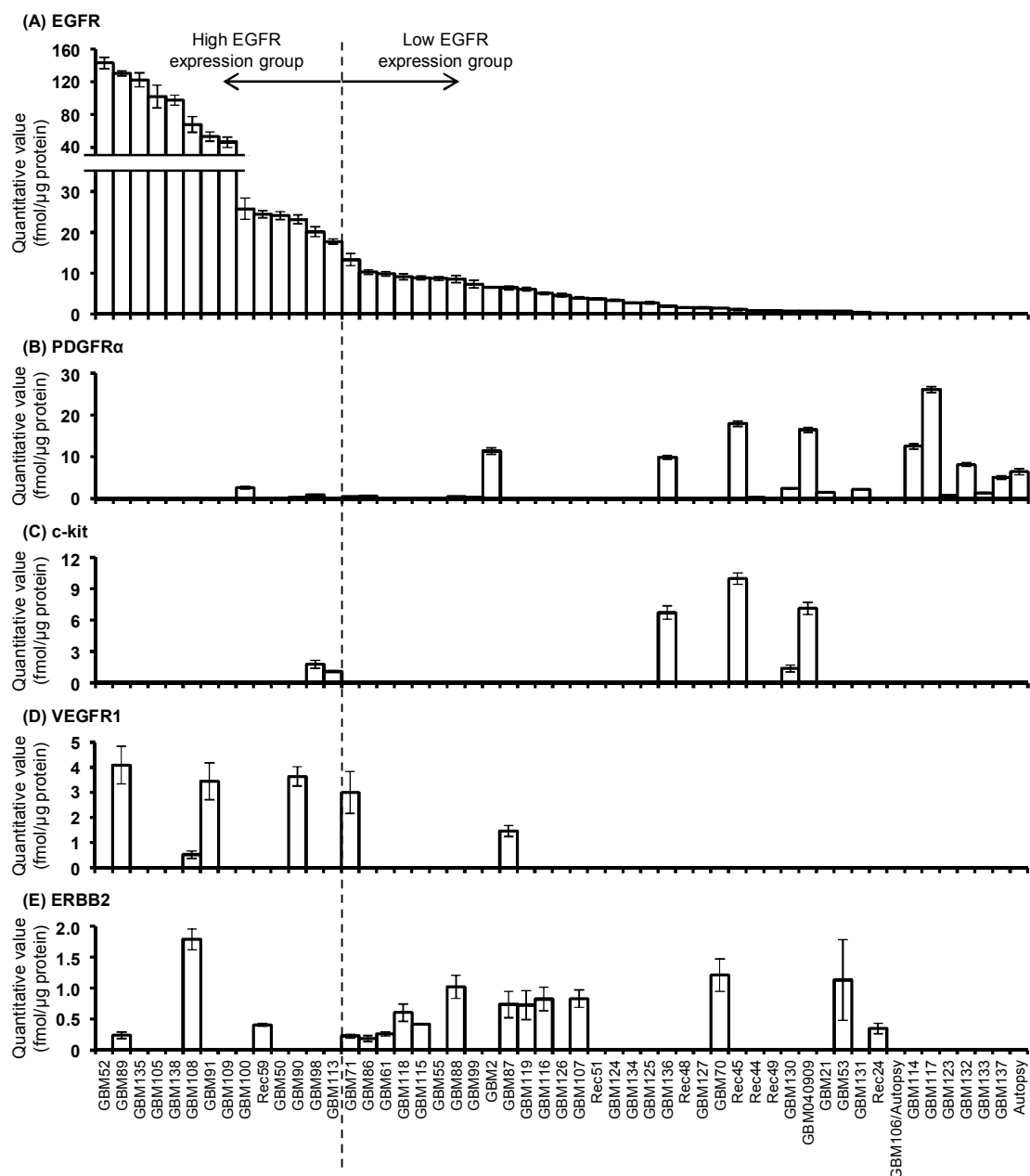


Fig. 3-2 Expression pattern of membrane receptor proteins in the plasma membrane fraction of GBM tissues

Plasma membrane fraction of GBM tissues and other brain tumor tissues were analyzed by multiplexed-SRM/MRM analysis using LC-MS/MS. Each bar represents protein expression level in plasma membrane fraction (the mean \pm S.E.M., $n=2-4$ SRM/MRM transitions).

3-2-3. 悪性脳腫瘍組織の種類間における膜タンパク質発現量比較

本研究では GBM 組織検体に加え、転移性脳腫瘍やその他の脳腫瘍など異なる種類の組織検体を用いて発現解析を行った。従って、これらの腫瘍の種類間で膜タンパク質の発現傾向が異なるのかを検証するため、腫瘍種類間における膜タンパク質発現量の比較解析を行った。なお、本研究で発現解析を行った組織検体を以下の 4 群に分類し、「分子標的薬標的分子および標的候補分子」、「ABC トランスポーター」、「SLC トランスポーター」、「その他の膜タンパク質」の順に比較解析結果を記載した。

1. GBM 組織検体群(再発 GBM を含む)
2. 低グレードの悪性脳腫瘍組織検体群(Rec53/MRI+, Rec53/MRI-, Rec56, Rec58, AM2, AM4, DA27, DA28, DA34, AOA2, AA15, AA16, PA3, PXA20121023)
3. 肺癌由来転移性脳腫瘍組織検体群
4. 非腫瘍脳組織検体群

<分子標的薬標的分子および標的候補分子発現の比較解析>

4 群間における分子標的薬標的分子および標的候補分子発現量の比較解析結果を **Fig. 3-3** に示す。非腫瘍脳組織検体では EGFR および CD37 のみ発現が認められ、その他の分子の発現は認められなかった。さらに、非腫瘍脳組織検体における EGFR および CD37 の平均発現量はその他 3 群の悪性脳腫瘍組織検体と比較して低いことが認められた(**Fig. 3-3C, K**)。また、PDGFR α , EGFR, VEGFR1 の発現は GBM 組織検体においてその他の 3 群と比較して高い傾向であった(**Fig. 3-3A, C, E**)。ERBB2 に関しては肺癌由来の転移性脳腫瘍組織検体においてその他の 3 群と比較して有意に高発現していることが認められた(**Fig. 3-3D**)。さらに、GBM 組織検体および非腫瘍脳組織検体と比較して肺癌由来転移性脳腫瘍組織検

体では CD37 が有意に高発現していることも認められた(Fig. 3-3K)。

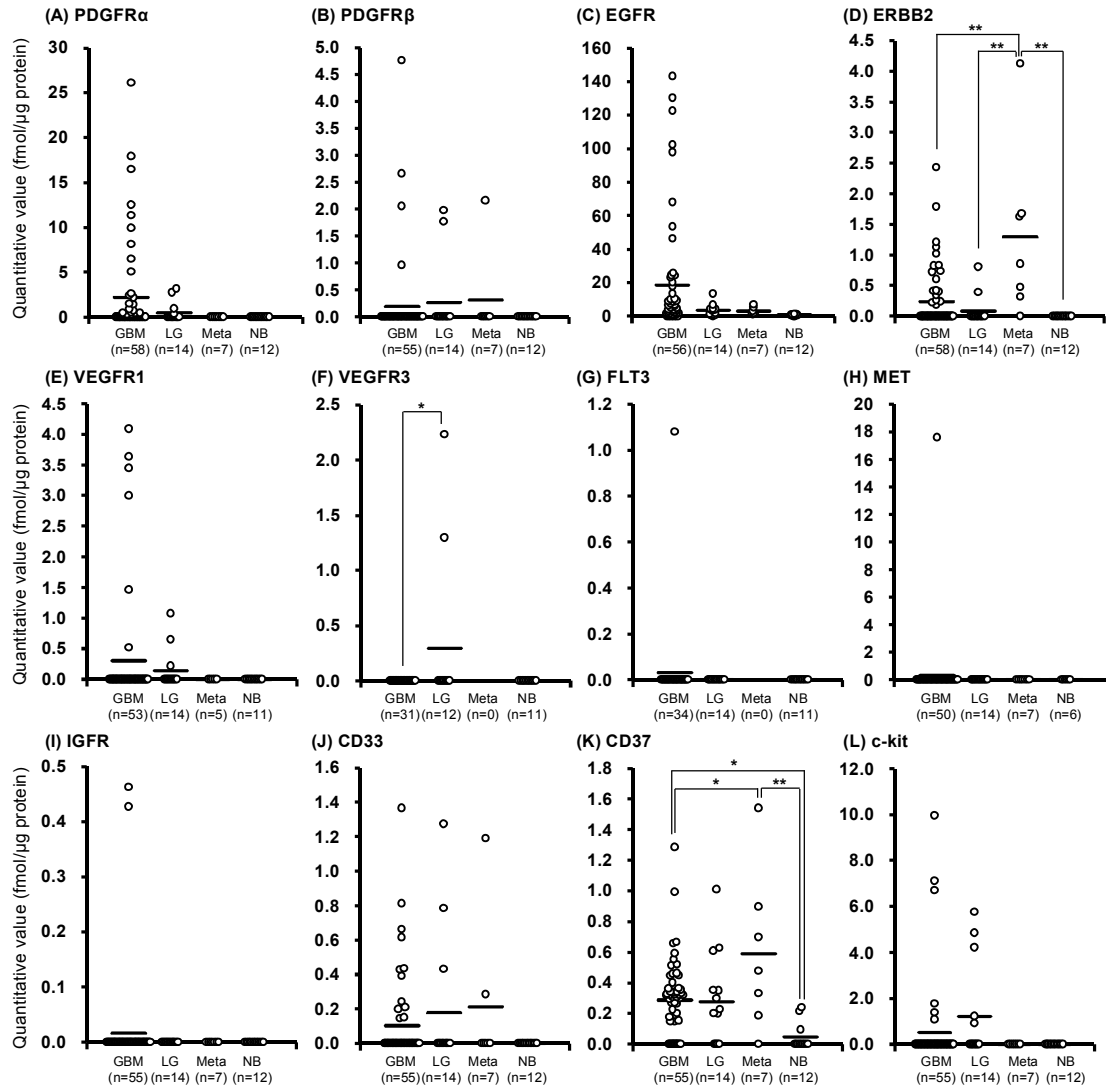


Fig. 3-3 Comparison of protein expression level of target proteins for molecular-targeted drugs among GBM, low-grade brain tumor, metastatic brain tumor from lung cancer, and normal brain tissues

Each dot represents protein expression level in plasma membrane fraction of each patient and each bar represents the mean value (GBM: n=31-58, LG: n=12-14, Meta: n=0-7, NB: n=6-12). GBM: glioblastoma multiform, LG: low-grade brain tumor, Meta: metastatic brain tumor from lung cancer, NB: normal brain tissue, *p<0.05, **p<0.01

＜ABC トランスポーター発現の比較解析＞

4 群間における ABC トランスポータータンパク質(MDR1, MRP1, MRP4, BCRP)発現量の比較解析結果を **Fig. 3-4** に示す。**Fig. 3-3** に示した分子標的薬標的分子と同様に、非腫瘍脳組織検体における ABC トランスポータータンパク質発現量はその他の 3 群の悪性脳腫瘍組織検体と比較して低い傾向にあることが認められた。特に、MRP4 に関しては非腫瘍脳組織検体において有意に低発現しており、MRP1 に関しては全ての非腫瘍組織検体において発現が検出されなかった(**Fig. 3-3B, C, Table 3-2**)。また、肺癌由来転移性脳腫瘍組織検体における MRP1 発現および低グレード悪性脳腫瘍組織検体における BCRP 発現は、それぞれその他の 3 群と比較して有意に高発現していることが認められた(**Fig. 3-3B, D**)。

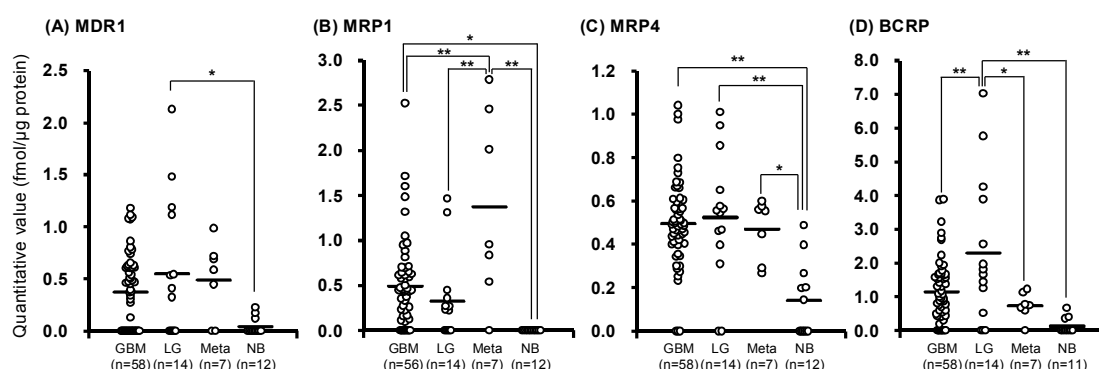


Fig. 3-4 Comparison of ABC transporter protein expression level among GBM, low-grade brain tumor, metastatic brain tumor from lung cancer, and normal brain tissues

Each dot represents protein expression level in plasma membrane fraction of each patient and each bar represents the mean value (GBM: n=56-58, LG: n=14, Meta: n=7, NB: n=11-12). GBM: glioblastoma multiform, LG: low-grade brain tumor, Meta: metastatic brain tumor from lung cancer, NB: normal brain tissue, *p<0.05, **p<0.01

<SLC トランスポーター発現の比較解析>

4 群間における SLC トランスポータータンパク質発現量の比較解析結果を **Fig. 3-5** に示す。肺癌由来転移性脳腫瘍において ASCT2, MCT4, PCFT の 3 分子はその他の 3 群と比較して有意に高発現していた(**Fig. 3-5A, D, I**)。GLUT1 および MCT1 は非腫瘍脳組織検体と比較して悪性脳腫瘍組織検体で高発現している傾向が認められた(**Fig. 3-5B, F**)。さらに、GBM 組織検体において MCT1 は肺癌由来転移性脳腫瘍および非腫瘍脳組織と比較して有意に高発現していた(**Fig. 3-5F**)。一方で、肺癌由来転移性脳腫瘍検体および非腫瘍脳組織検体において GLUT3/14 はその他の 2 群と比較して高発現している傾向が認められた(**Fig. 3-5C**)。

<その他の膜タンパク質発現の比較解析>

4 群間におけるその他の膜タンパク質(Claudin5, JAM-A, β -catenin, PECAM1, γ -gtp, Na^+/K^+ ATPase)発現量の比較解析結果を **Fig. 3-6** に示す。肺癌由来転移性脳腫瘍組織検体において JAM-A および γ -gtp がその他の 3 群と比較して有意に高発現していることが認められた(**Fig. 3-6B, E**)。さらに、 β -catenin および PECAM1 に関してもその他の 3 群と比較して肺癌由来転移性脳腫瘍組織検体では高発現している傾向が認められた(**Fig. 3-6C, D**)。Claudin-5 に関しては、低グレードの悪性脳腫瘍組織検体で高発現している傾向が認められ、特に GBM 組織検体および非腫瘍脳組織検体に対しては有意に高発現していることが認められた(**Fig. 3-6A**)。さらに、膜マーカートンパク質である Na^+/K^+ ATPase に関しては非腫瘍脳組織において有意に高発現しているという結果となった(**Fig. 3-6F**)。

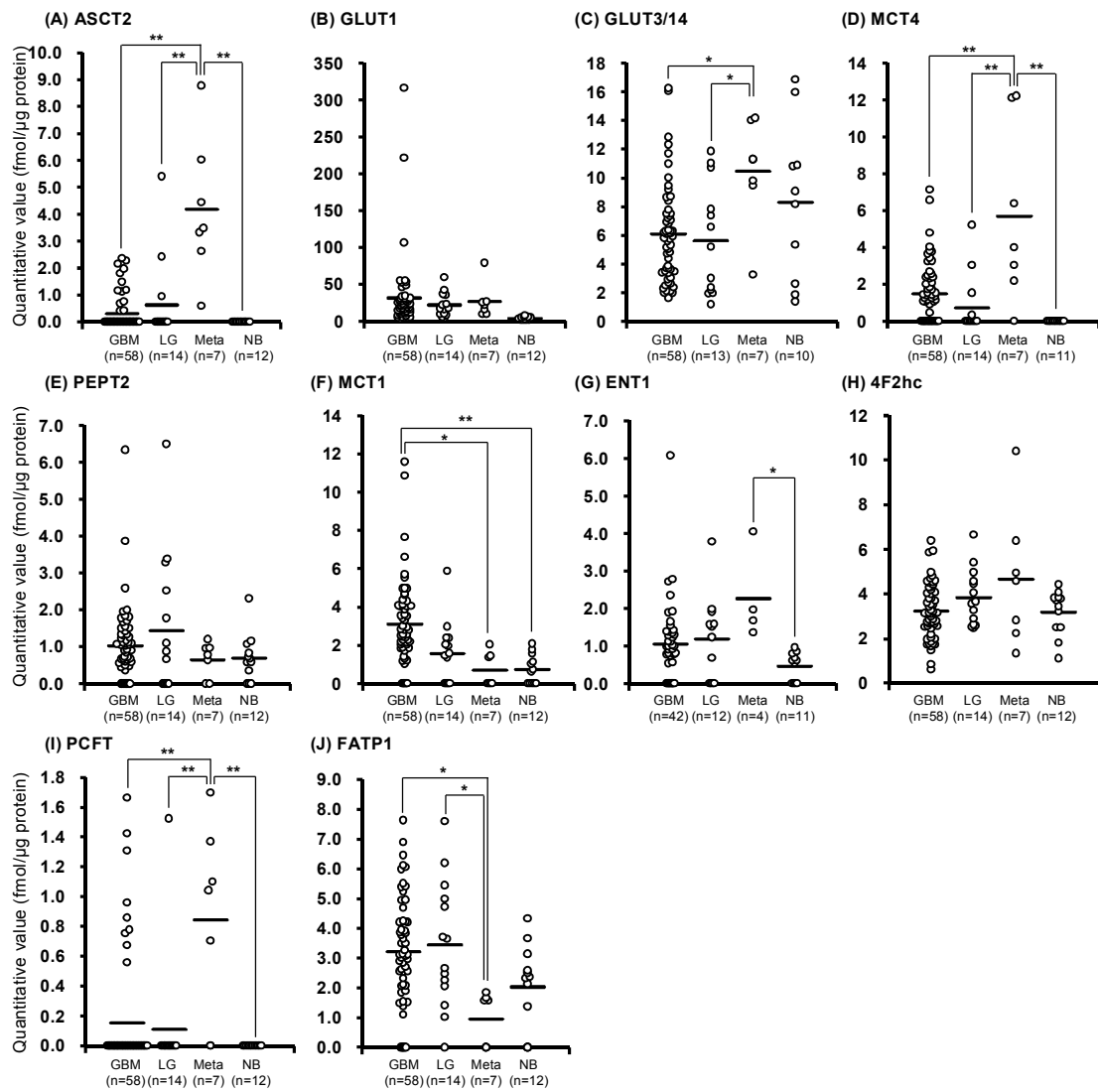


Fig. 3-5 Comparison of SLC transporter protein expression level among GBM, low-grade brain tumor, metastatic brain tumor from lung cancer, and normal brain tissues

Each dot represents protein expression level in plasma membrane fraction of each patient and each bar represents the mean value (GBM: n=42-58, LG: n=12-14, Meta: n=4-7, NB: n=10-12). GBM: glioblastoma multiform, LG: low-grade brain tumor, Meta: metastatic brain tumor from lung cancer, NB: normal brain tissue, *p<0.05, **p<0.01

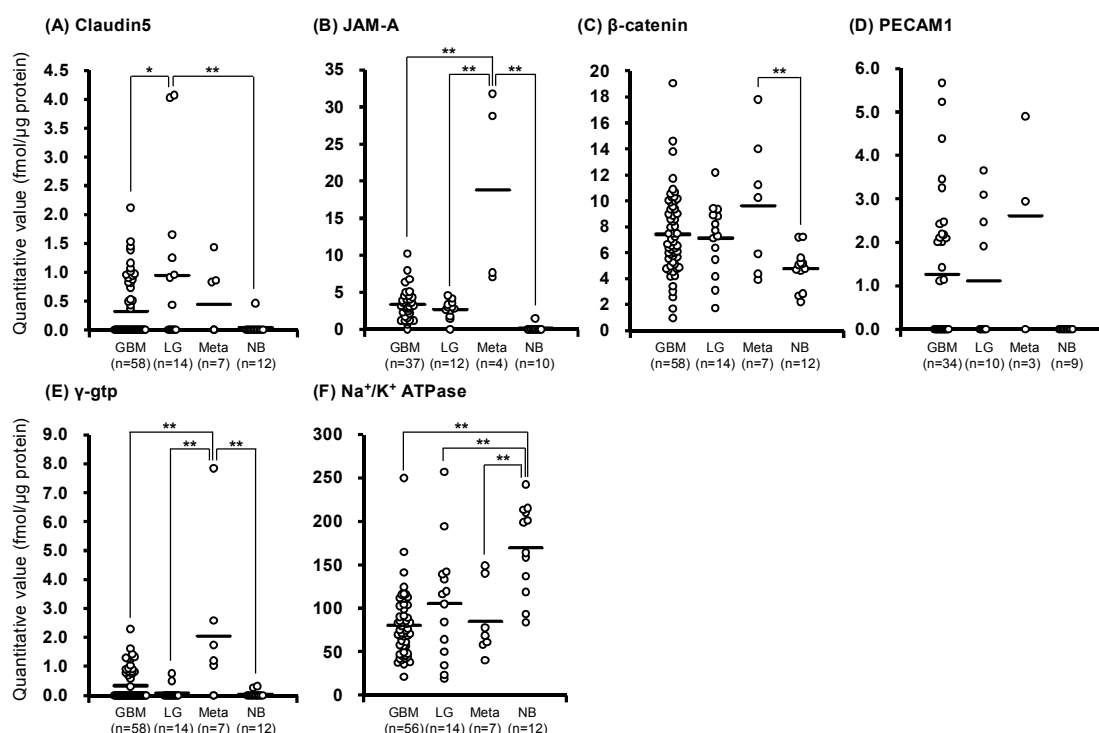


Fig. 3-6 Comparison of other membrane protein expression level among GBM, low-grade brain tumor, metastatic brain tumor from lung cancer, and normal brain tissues

Each dot represents protein expression level in plasma membrane fraction of each patient and each bar represents the mean value (GBM: n=34-58, LG: n=10-14, Meta: n=3-7, NB: n=9-12). GBM: glioblastoma multiform, LG: low-grade brain tumor, Meta: metastatic brain tumor from lung cancer, NB: normal brain tissue, *p<0.05, **p<0.01

3-2-4. 同一患者の初発時および再発時における膜タンパク質発現量比較

本研究で解析を行った再発性悪性脳腫瘍組織検体の中でも、Rec45, Rec29, Rec24, Rec48, Rec51, Rec59, Rec49, Rec58 に関してはそれぞれ GBM040909, GBM45, GBM53, GBM71, GBM89, GBM105, Rec44, AA15 の再発例となっている (Table 3-1)。なお、退形成星状細胞腫(WHO grade III)検体である Rec58/AA15 を除いて全て GBM 患者の再発例である。同一患者で再発時に膜タンパク質の発現量に変動するかを検証するため、それぞれの検体で初発時と再発時の検体における膜タンパク質発現量の比較解析を行った (Fig. 3-7)。各検体によって初発時と

比較して再発時に発現量が増加した分子と減少した分子は異なっており共通した傾向は認められなかったが、多くの分子はその発現変動が 2 倍以内に収まるという結果となった。しかし、再発例 Rec51 では初発時と比較して 2 倍以上発現量が減少した分子数が今回比較解析を行った検体の中で最も多く、特に EGFR の発現量は初発時(GBM89)と比較してわずか 2.87%に低下していることが認められた(**Fig. 3-7E**)。また、再発時に 2 倍以上発現量が増加した分子の例として GLUT1 が挙げられ、Rec29 においてその初発時検体である GBM45 と比較して 11.9 倍発現の増加が認められた(**Fig. 3-7B**)。

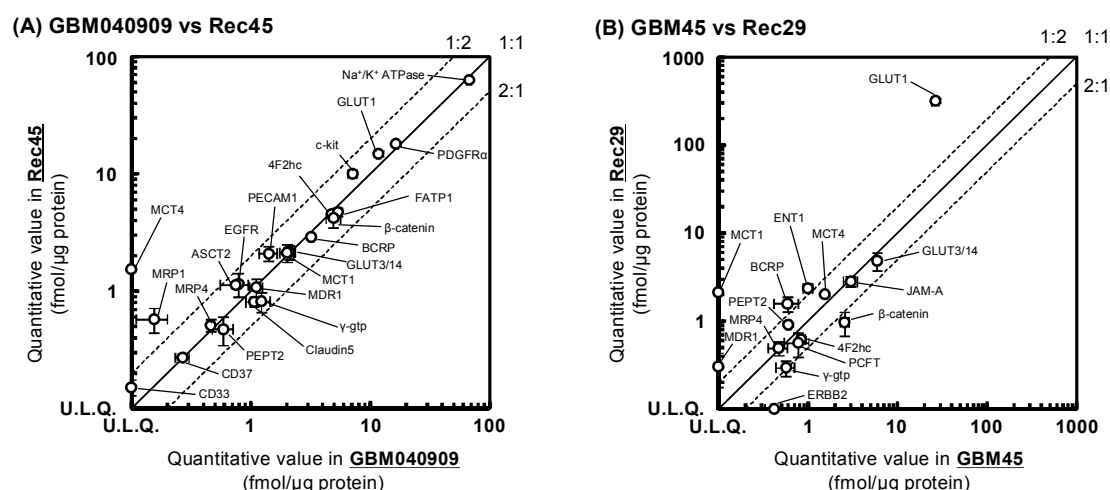


Fig. 3-7 Comparison of protein expression level between primary tumor and recurrent tumor from same patient
 GBM040909, GBM45, GBM53, GBM70, GBM89, GBM105, Rec44 and AA15 represent primary tumors. Rec45, Rec29, Rec24, Rec48, Rec51, Rec59, Rec49 and Rec58 represent recurrent tumors. Each dot represents protein expression level in plasma membrane fraction (mean±S.E.M, n=2-4 SRM/MRM transitions). U.L.Q. means “under the limit of quantification”.

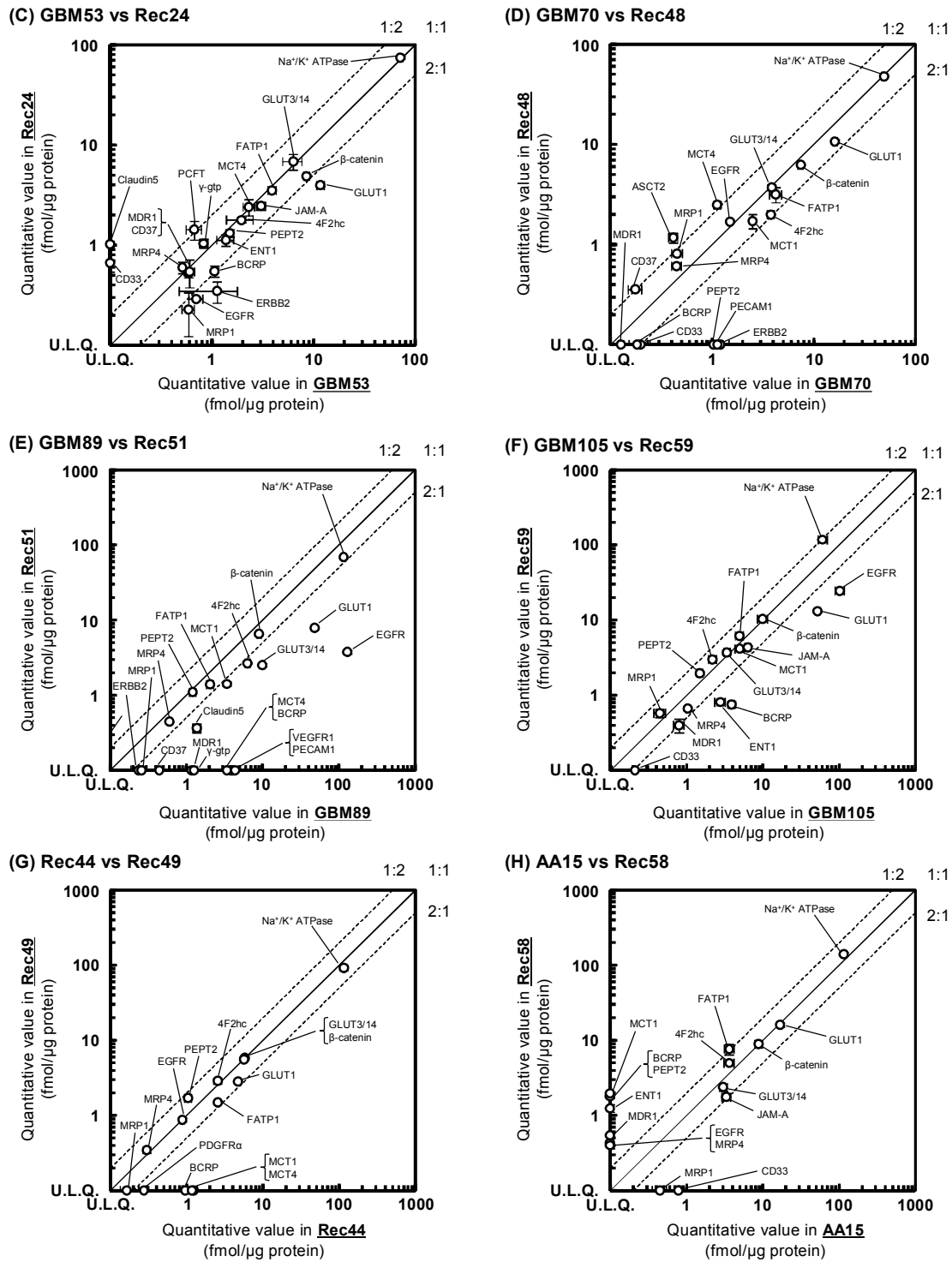


Fig. 3-7 Comparison of protein expression level between primary tumor and recurrent tumor from same patient (Continued)

GBM040909, GBM45, GBM53, GBM70, GBM89, GBM105, Rec44 and AA15 represent primary tumors. Rec45, Rec29, Rec24, Rec48, Rec51, Rec59, Rec49 and Rec58 represent recurrent tumors. Each dot represents protein expression level in plasma membrane fraction (mean±S.E.M, n=2-4 SRM/MRM transitions). U.L.Q. means “under the limit of quantification”.

3-2-5. 同一患者の腫瘍部位および非腫瘍部位における膜タンパク質発現量比較

本研究で解析を行った非腫瘍脳組織検体の中でも、GBM99/Normal, GBM115/Normal, GBM125/Normal, GBM137/Normal, GBM138/Normal, NB43, NB40 に関してはそれぞれ GBM99, GBM115, GBM125, GBM137, GBM138, PNET1, DA27 の非腫瘍部位となっている(**Table 3-1**)。同一患者での腫瘍部位および非腫瘍部位において膜タンパク質の発現プロファイルが異なるかを検証するため、それぞれの検体で腫瘍部位と非腫瘍部位の検体における膜タンパク質発現量の比較解析を行った(**Fig. 3-8**)。同一患者において、多くの膜タンパク質は非腫瘍部位と比較して腫瘍部位で発現量が増加しており、腫瘍部位と非腫瘍部位との間では 2 倍以上の発現量差が認められる分子の数が多いという結果であった。しかし一方で、星状細胞腫(WHO grade II)である DA27 においてはその非腫瘍部位検体である NB40 との間の発現量差が GBM 検体と比較して少なく、多くの分子の発現量差が 2 倍以内に収まることが認められた(**Fig. 3-8G**)。

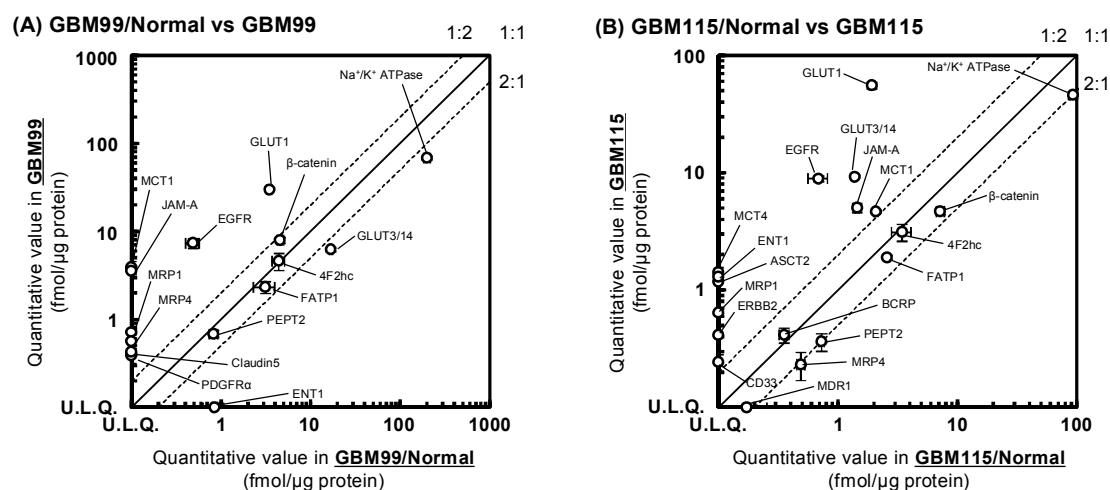
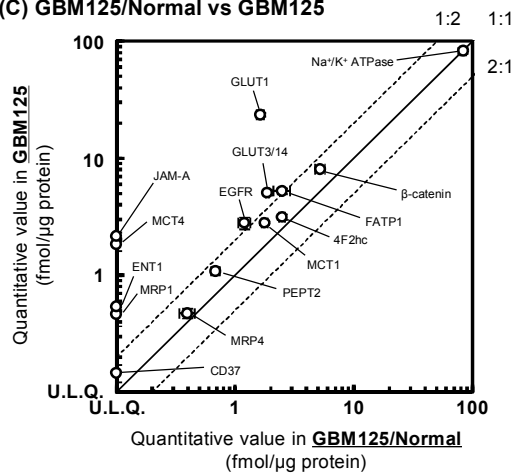


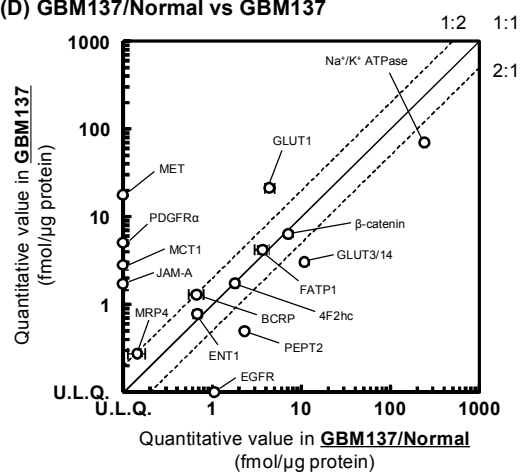
Fig. 3-8 Comparison of protein expression level between normal region and tumor region from same patient

GBM99/Normal, GBM115/Normal, GBM125/Normal, GBM137/Normal, GBM138/Normal, NB43, and NB40 represent normal region. GBM99, GBM115, GBM125, GBM137, GBM138, PNET1, and DA27 represent recurrent tumors. Each dot represents protein expression level in plasma membrane fraction (mean±S.E.M, n=2-4 SRM/MRM transitions). U.L.Q. means “under the limit of quantification”.

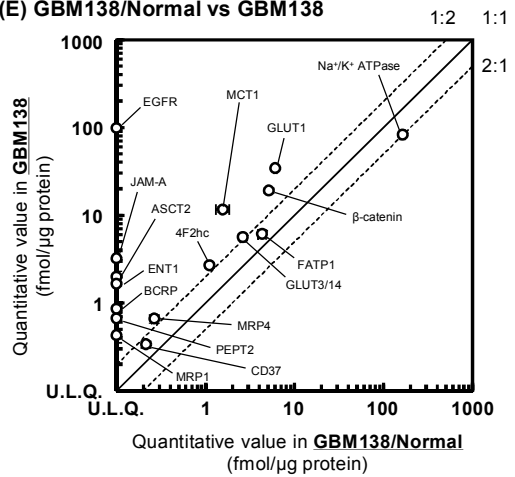
(C) GBM125/Normal vs GBM125



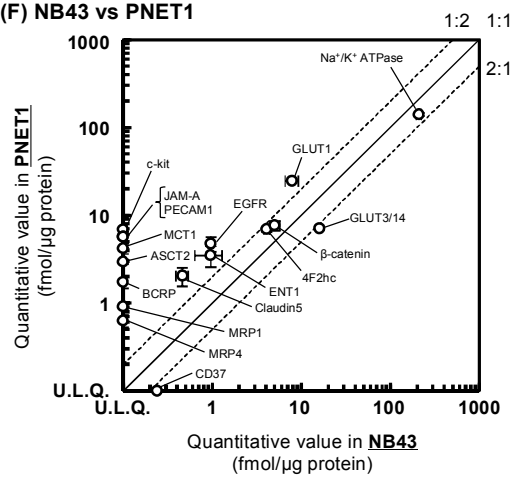
(D) GBM137/Normal vs GBM137



(E) GBM138/Normal vs GBM138



(F) NB43 vs PNET1



(G) NB40 vs DA27

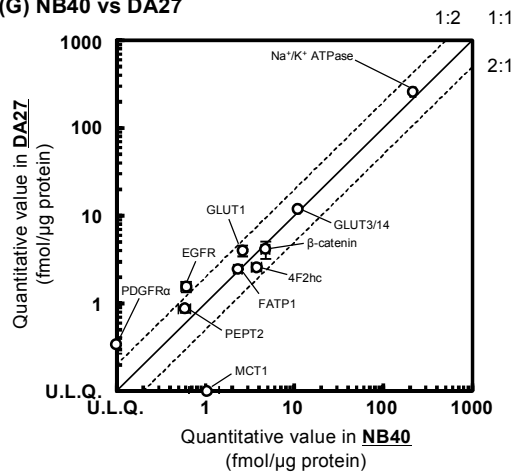


Fig. 3-8 Comparison of protein expression level between normal region and tumor region from same patient (Continued)

GBM99/Normal, GBM115/Normal, GBM125/Normal, GBM137/Normal, GBM138/Normal, NB43, and NB40 represent normal region. GBM99, GBM115, GBM125, GBM137, GBM138, PNET1, and DA27 represent recurrent tumors. Each dot represents protein expression level in plasma membrane fraction (mean±S.E.M, n=2-4 SRM/MRM transitions). U.L.Q. means “under the limit of quantification”.

3-2-6. GBM 検体における膜タンパク質発現量と予後指標との比較

膜タンパク質の発現には大きな個人差が認められたため、GBM 組織検体における膜タンパク質発現量と予後指標である生存期間および無増悪生存期間(PFS)との比較解析を行った(**Table 3-4**)。予後指標との間に有意な相関係数が認められたのは MCT1 のみ(vs 生存期間: $r=-0.460$, $p=0.014$)であったが、予後指標と高い相関性を示す膜タンパク質は認められなかった。

Table 3-4 Correlation between protein expression levels and prognostic indicator among GBM patients

Correlation coefficient (r)			
vs Survival time		vs PFS	
<i>Positive correlation</i>		<i>Positive correlation</i>	
ENT1	0.209 (n=15, p=0.454)	c-kit	0.348 (n=31, p=0.055)
PDGFR α	0.181 (n=28, p=0.358)	PDGFR α	0.221 (n=34, p=0.209)
MDR1	0.178 (n=28, p=0.365)	GLUT1	0.156 (n=34, p=0.379)
γ -gtp	0.158 (n=28, p=0.421)	Claudin5	0.083 (n=34, p=0.641)
Claudin5	0.067 (n=28, p=0.736)	ENT1	0.058 (n=21, p=0.804)
c-kit	0.043 (n=26, p=0.836)	BCRP	0.057 (n=34, p=0.749)
BCRP	0.034 (n=28, p=0.862)	EGFR	0.045 (n=32, p=0.806)
ASCT2	0.018 (n=28, p=0.928)	ASCT2	0.021 (n=34, p=0.907)
<i>Negative correlation</i>		PDGFR β	0.019 (n=31, p=0.920)
MCT1	-0.460 (n=28, p=0.014)	MDR1	0.013 (n=34, p=0.940)
JAM-A	-0.339 (n=11, p=0.308)	Na ⁺ /K ⁺ ATPase	0.010 (n=32, p=0.955)
Na ⁺ /K ⁺ ATPase	-0.308 (n=27, p=0.118)	FATP1	0.002 (n=34, p=0.990)
MRP1	-0.262 (n=27, p=0.188)	<i>Negative correlation</i>	
β -catenin	-0.251 (n=28, p=0.198)	MCT4	-0.333 (n=34, p=0.054)
GLUT1	-0.246 (n=28, p=0.207)	GLUT3/14	-0.234 (n=34, p=0.182)
PECAM1	-0.233 (n=25, p=0.262)	MRP1	-0.201 (n=32, p=0.270)
GLUT3/14	-0.193 (n=28, p=0.326)	CD37	-0.195 (n=31, p=0.292)
VEGFR1	-0.192 (n=24, p=0.368)	β -catenin	-0.188 (n=34, p=0.288)
MCT4	-0.180 (n=28, p=0.361)	VEGFR1	-0.185 (n=30, p=0.328)
ERBB2	-0.165 (n=28, p=0.402)	MCT1	-0.185 (n=34, p=0.296)
CD33	-0.163 (n=26, p=0.428)	CD33	-0.184 (n=31, p=0.322)
PEPT2	-0.132 (n=28, p=0.503)	4F2hc	-0.162 (n=34, p=0.359)
PDGFR β	-0.081 (n=26, p=0.693)	PCFT	-0.152 (n=34, p=0.391)
4F2hc	-0.077 (n=28, p=0.698)	ERBB2	-0.130 (n=34, p=0.463)
CD37	-0.058 (n=26, p=0.778)	γ -gtp	-0.127 (n=34, p=0.474)
PCFT	-0.052 (n=28, p=0.793)	PECAM1	-0.100 (n=28, p=0.611)
MRP4	-0.028 (n=28, p=0.886)	JAM-A	-0.063 (n=16, p=0.816)
EGFR	-0.018 (n=27, p=0.928)	PEPT2	-0.038 (n=34, p=0.832)
FATP1	-0.011 (n=28, p=0.955)	MRP4	-0.021 (n=34, p=0.904)

Survival time and PFS (progression-free survival) after surgery were used as a prognostic indicator. The correlation between protein expression levels and prognostic indicator was represented by coefficient of correlation (R). n: number of cases

3-2-7. 同一患者の MRI 造影および非造影領域における膜タンパク質発現量

Table 3-1 に示す通り Rec53 は oligodendroglioma (WHO grade II) の検体であり、MRI 造影領域(Rec53/MRI+)および MRI 非造影領域(Rec53/MRI-)の検体が存在する。MRI 造影状態において膜タンパク質の発現量が変動しているかを調べるために、これら領域(Rec53/MRI+および Rec53/MRI-)における膜タンパク質発現の比較解析を行った(Fig. 3-9)。Rec53 の検体において増殖因子受容体等の発現は EGFR のみ認められ(Table 3-2)、MRI 造影に関わらずほぼ同程度の EGFR 発現であった(Fig. 3-9)。なお、MDR1, BCRP, Claudin5 などの分子は MRI 造影領域(Rec53/MRI+)において高発現している傾向が認められた(Fig. 3-9)。

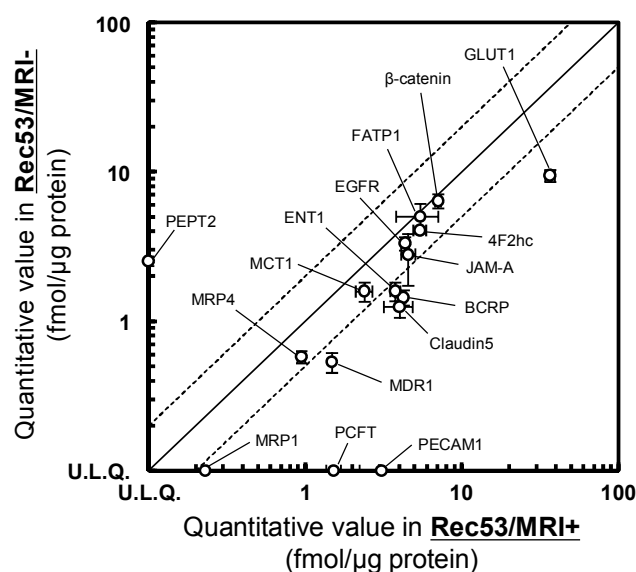


Fig. 3-9 Comparison of protein expression level between MRI positive tissue and MRI negative tissue from same patient

Rec53/MRI+ represents MRI positive region of oligodendroglioma, and Rec53/MRI- represents MRI negative region of oligodendroglioma. Each dot represents protein expression level in plasma membrane fraction (mean±S.E.M, n=2-4 SRM/MRM transitions). U.L.Q. means “under the limit of quantification”.

第3節 考察

悪性脳腫瘍組織における膜タンパク質発現およびその個人差について

本研究は GBM を含む悪性脳腫瘍組織の細胞膜画分における分子標的薬標的分子やトランスポーターなどの複数の膜タンパク質の絶対発現量を明らかにした初めての報告である。これまでに、悪性脳腫瘍組織において EGFR, PDGFR α , PDGFR β , ERBB2, VEGFR1, VEGFR2, c-kit などの分子標的薬標的分子の発現が遺伝子レベルまたはタンパク質レベルで報告されている(Koka *et al.*, 2003, Biernat *et al.*, 2004, Steiner *et al.*, 2004, Joensuu *et al.*, 2005, Haberler *et al.*, 2006, Puputti *et al.*, 2006, Ranza *et al.*, 2007)。我々の解析結果からも多くのこれらの膜タンパク質発現は認められており、細胞膜上におけるタンパク質絶対発現量レベルで過去の報告と一致する結果を得た。これら分子標的薬標的分子の中でも EGFR の遺伝子増幅およびそれに伴う EGFR タンパク質過剰発現は GBM の特徴の一つとなっていることが報告されている(Gan *et al.*, 2013)。**Table 3-3** に示す通り GBM 組織の中の 85.7%において細胞膜上での EGFR タンパク質発現が認められており、これまでの報告と一致する結果となっている。さらに、EGFR の発現が認められた組織の中でも 496 倍もの個人差が認められており、定量限界以下であった組織も含めると EGFR 発現の個人差は少なくとも 2450 倍と非常に大きいことが示唆された(**Fig. 3-3**)。本研究の結果から、これまでに発現が報告されている PDGFR α , PDGFR β , ERBB2, VEGFR1, c-kit に関しては、EGFR と比較すると発現の認められた組織の割合および発現量ともに低いことが EGFR 同様に個人差が大きいことが認められた(**Table 3-3, Fig. 3-3**)。従って、GBM 組織の細胞膜画分に発現する主な分子標的薬標的分子は EGFR であり、絶対発現量も他の分子と比較して大きいことが示唆された。また、GBM 組織において EGFR に次いで発現頻度が大きい標的分子は CD37 であった(72.7%)。CD37 は非ホジキンリンパ腫の悪性

B 細胞に高発現することが報告されており (Deckert *et al.*, 2013)、今回解析を行った検体の中でも悪性リンパ腫検体である ML において非常に高発現していることが認められた (Table 3-2)。しかし、GBM 組織において CD37 が発現しているという報告はこれまでされておらず、悪性リンパ腫と比較すると発現量は低いものの GBM 組織で CD37 が発現していることが本研究によって初めて認められた。以上のように、悪性脳腫瘍組織における分子標的薬標的分子の絶対発現量には大きな個人差があることが認められたことから、患者それぞれに対して有効な分子標的薬は異なると考えられた。

GBM 組織検体間での増殖因子受容体発現プロファイルについて

これまでに、GBM は病理学的診断では同じ GBM であっても、GBM は primary GBM および secondary GBM の 2 つのグループに分類されることが報告されている。primary GBM は発症時から悪性度の高い GBM の性質を有して進行も早く、中心部の壊死や病巣周囲の浮腫が MRI 上で典型的に観察され、GBM 患者の 80% がこれに該当する。secondary GBM は low-grade glioma から徐々に悪性度が増し、およそ 1~10 年の期間を経て GBM に至った GBM である。これら primary GBM および secondary GBM では遺伝子発現プロファイルが異なり、primary GBM では EGFR 遺伝子増幅が、secondary GBM では PDGFR α 遺伝子増幅が認められることがこれまでに報告されている (Kleihues and Ohgaki, 1999, Puputti *et al.*, 2006)。また、GBM は遺伝子発現に基づいて 4 グループ (Proneural, Neural, Classical, Mesenchymal) に分類されることも報告されている (Verhaak *et al.*, 2010)。Fig. 3-2 に示す通り、GBM 患者を平均 EGFR 発現量で 2 グループに分割した場合、PDGFR α 高発現は EGFR 低発現群に主に属する傾向が認められた。また、c-kit の発現が認められる検体は PDGFR α の発現も認められた。実際に、PDGFR α の発現が認められた GBM 患者では c-kit も共発現している傾向が認められること

がすでに報告されている(Joensuu *et al.*, 2005)。従って、今回の結果と過去の報告を踏まえると PDGFR α の発現が認められる EGFR 低発現群に対しては c-kit に対する分子標的薬も効果がある可能性がある。このように GBM と診断された場合でも、各患者においてそれぞれ高発現している増殖因子受容体は異なることが示唆された。**Fig. 3-2** に示す通り、分子標的薬標的分子の発現から GBM を複数の群に分類できる可能性があり、GBM の分類ごとに分子標的薬の選択を行うという方針も考えられる。

悪性脳腫瘍組織の種類間における膜タンパク質発現量について

<分子標的薬標的分子および標的候補分子発現の比較解析について>

前述した通り悪性脳腫瘍組織における分子標的薬標的分子の発現には大きな個人差が認められたが、悪性脳腫瘍の種類間におけるタンパク質発現の傾向を調べた。**Fig. 3-3** および **Table 3-2** に示す通り、非腫瘍脳組織における分子標的薬標的分子の発現は悪性脳腫瘍組織と比較して低発現していることが認められた。このように、悪性脳腫瘍組織における標的分子の発現は主に腫瘍部位に認められるため、これら標的分子は悪性脳腫瘍に対する分子標的療法の標的となり得ることを示唆している。また、過去の報告で EGFR や PDGFR α 遺伝子発現は脳腫瘍の grade が上がるにつれて増加する傾向があることが認められている(Diedrich *et al.*, 1995, Guha *et al.*, 1995)。**Fig. 3-3A, C** に示す通り、WHO grade IV の GBM 組織における EGFR および PDGFR α の発現は low-grade brain tumor 群と比較して高い傾向にあり、細胞膜上のタンパク質レベルでこの報告と同様の傾向を示している。一方で、ERBB2 は肺癌由来の転移性脳腫瘍で他の 3 群と比較して有意に高発現していることが認められた(**Fig. 3-3D**)。また、原発巣が異なるために **Fig. 3-2** には含めていないが、乳癌由来の転移性脳腫瘍である Meta29 では ERBB2 が 104 fmol/ug protein と非常に高発現しており、その値は GBM 組織の

平均発現量(0.238 fmol/ug protein)の 437 倍となっている。ERBB2 は肺癌組織において発現が認められることが報告されており (Bellezza *et al.*, 2013)、乳癌に関しては多くの報告で ERBB2 の過剰発現が認められている (Slamon *et al.*, 2001, Dowsett *et al.*, 2003, Rivenbark *et al.*, 2013)。従って、これら転移性脳腫瘍における膜タンパク質の発現は原発巣の性質を反映していると考えられる。

<ABC トランスポーター発現の比較解析について>

Fig. 3-4 に示す通り、ABC トランスポーター(MDR1, MRP1, MRP4, BCRP)に関しては非腫瘍脳組織と比較して悪性脳腫瘍組織において **up-regulation** していることが認められた。第 2 章で述べた通り、これらのトランスポーターは抗癌剤を細胞外へと排出して細胞内濃度を低下させることが報告されており、悪性腫瘍の抗癌剤耐性化の原因タンパク質の一つとして考えられている (Szakacs *et al.*, 2006)。これらトランスポーターは分子標的薬の排出に関与することも報告されている。EGFR の tyrosine kinase inhibitor (TKI) である erlotinib および gefitinib は BCRP によって細胞外へと排出されることが報告されており、BCRP 発現によって erlotinib および gefitinib に対して耐性化することが報告されている (Li *et al.*, 2007, Lemos *et al.*, 2009)。また、同様に TKI である imatinib や sunitinib, sorafenib に関しても BCRP や MDR1 によって輸送されることが報告されている (Dai *et al.*, 2003, Burger *et al.*, 2004, Hu *et al.*, 2009, Lagas *et al.*, 2010, Tang *et al.*, 2012)。従って、悪性脳腫瘍組織における標的分子の発現情報から分子標的薬の選択を行う際はこれら排出トランスポーターの発現量も考慮に入れる必要があることが示唆された。

これまでの報告で、MDR1 や BCRP は腫瘍部位と正常部位との発現差が認められないことや GBM 細胞株において MDR1 の発現は認められないといった報告が存在する (Decleves *et al.*, 2002, Peignan *et al.*, 2011)。しかし、**Fig. 3-4** に示す

通り、細胞膜上のタンパク質発現レベルで非腫瘍脳組織と比較して高発現が認められたことから、GBM 組織の細胞膜上にも MDR1 や BCRP は発現していることが示唆された。しかし、MDR1 および BCRP は脳毛細血管内皮細胞に発現している分子でもある(Uchida *et al.*, 2011)。従って、腫瘍細胞自体の細胞膜上に発現している可能性以外にも、腫瘍内の血管密度が非腫瘍脳組織と比較して亢進している結果、GBM 組織で up-regulation している可能性がある。一方で、MRP1 は血管特異的に発現している分子ではないため、腫瘍細胞自体で up regulation していると考えられ、実際に GBM 組織を用いた免疫染色の結果 MRP1 は腫瘍部位で強く染色され腫瘍周辺部位ではわずかに染色が認められたといった報告が存在する(Peignan *et al.*, 2011)。いずれにしても、これら排出トランスポーターは脳腫瘍部位への薬物送達、および腫瘍細胞内への薬物送達の双方に影響を及ぼす可能性がある。

<SLC トランスポーター発現の比較解析について>

Fig. 3-5A に示す通り ASCT2 は非腫瘍脳組織と比較して腫瘍部位で高発現していることが認められた。過去の報告からも、high grade glioma 組織および転移性脳腫瘍組織において ASCT2 は腫瘍部位に mRNA レベルで高発現していることから ASCT2 は脳腫瘍の悪性化において重要な役割を担っている可能性がある(Sidoryk *et al.*, 2004)。また、今回の結果から ASCT2 は特に肺癌由来の転移性脳腫瘍において高発現している傾向が認められた。正常マウスを用いた asct2 の mRNA レベルでの組織分布の報告ではあるが、脳に発現が認められなかった一方で肺に高発現が認められた(Utsunomiya-Tate *et al.*, 1996)ことから、原発組織である肺の性質を一部保持していた可能性がある。

悪性腫瘍の診断において PET 検査が行われている通り、腫瘍では GLUT1 が高発現していることが報告されている(Chung *et al.*, 1999, Riedl *et al.*, 2007)。悪性

脳腫瘍においても GLUT1 の発現は grade が上がるほど発現している割合が高くなることが報告されており (Nishioka *et al.*, 1992)、本研究の結果からも非腫瘍脳組織と比較して GLUT1 発現量は腫瘍組織で高く、腫瘍組織においても low-grade brain tumor 群と比較して GBM 群において多少高発現している傾向が認められた (Fig. 3-5B)。

現在、悪性脳腫瘍摘出時に腫瘍の位置を同定するため様々な手法が用いられており、その中の一つの手法として 5-aminolevulinic acid (5-ALA) を使用した腫瘍部位の可視化が行われている。脳腫瘍手術時に 5-ALA を投与すると腫瘍部位に 5-ALA が蓄積し、代謝を受けることで赤い蛍光を生じ、可視化が可能となる (Coluccia *et al.*, 2010)。この 5-ALA は PEPT2 の基質となり、PEPT2 を介して細胞内へと取り込まれることが報告されている (Ocheltree *et al.*, 2004)。Fig. 3-5E に示す通り、悪性脳腫瘍患者において PEPT2 の発現が認められ、その発現量は非腫瘍脳組織と比較して高発現している傾向が認められた。従って、投与された 5-ALA が PEPT2 によって腫瘍部位に取り込まれることによって可視化されると考えられる。しかし一方で、転移性脳腫瘍では半数以上の患者において 5-ALA による腫瘍部位の可視化がされないという報告もある (Miyatake *et al.*, 2009)。Fig. 3-5E に示す通り、肺癌由来の転移性脳腫瘍における PEPT2 発現量は非腫瘍脳組織と同程度であることが、転移性脳腫瘍が 5-ALA によって可視化されにくい原因の一つであると考えられる。Fig. 3-5A, D に示す通り、転移性脳腫瘍では ASCT2 や MCT4 などが非腫瘍脳組織と比較して有意に高発現していることから、これらのトランスポーターの基質となるような可視化プローブが転移性脳腫瘍の可視化に使用できる可能性がある。

Fig. 3-5F から MCT1 の発現は非腫瘍脳組織と比較して腫瘍組織で高発現しており、さらに腫瘍の grade が高い程高発現していることが認められ、これは免疫染色を用いた過去の報告と傾向が一致している (Froberg *et al.*, 2001)。さらに、Fig.

3-5D に示す通り MCT4 に関しても非腫瘍脳組織と比較して GBM で高発現していることが認められた。MCT1 の腫瘍組織内での局在についてであるが、MCT1 は腫瘍部位の中でも腫瘍と正常組織の境界部位に最も多く発現していることが報告されている(Grillon *et al.*, 2011)。また、これまでに低酸素条件下において MCT4 の発現上昇が認められることが報告されている(Ullah *et al.*, 2006)。さらに、MCT1 は多くの組織で発現している一方で、MCT4 は過剰に蓄積した乳酸を排出する必要のある解糖系の亢進した組織に高発現していることが報告されている。今回 MCT1 および MCT4 とともに GBM 組織において発現が認められているため、これらの報告から GBM 組織において低酸素条件下である腫瘍中心部位では MCT4 が、周辺部位では MCT1 が発現している可能性がある。そして、低酸素条件下にある腫瘍中心部で嫌氣的解糖によって細胞内に蓄積した乳酸が MCT4 によって細胞外へと排出され、周辺部にある MCT1 発現腫瘍細胞がその乳酸をエネルギー源として細胞内へと取り込むと考えられる。MCT1 発現細胞における乳酸取り込み速度を上回る乳酸排出が腫瘍中心部の MCT4 発現細胞で行われた場合、高濃度になった細胞外の乳酸によって pH が下がり癌細胞周辺の組織が損傷を受け浸潤が促進されるという仮説が立てられる。このように今回 GBM 組織において発現が認められた MCT1 および MCT4 は腫瘍の浸潤能を示す指標になる可能性がある。

<その他の膜タンパク質発現の比較解析について>

Fig. 3-6 は脳腫瘍の種類間におけるその他の膜タンパク質(Claudin5, JAM-A, β -catenin, PECAM1, γ -gtp, Na^+/K^+ ATPase)の発現分布の比較を示している。これらの分子の中でも特に JAM-A に関して肺癌由来の転移性脳腫瘍において顕著に高発現していることが認められた。これまでは、GBM に関する報告ではないが tight junction の構成タンパク質の一つである JAM-A を knockdown することで細胞の

浸潤能が増加するなど、JAM-A 発現の低下が腫瘍の悪性化に関与すると考えられてきた(Naik *et al.*, 2008)。しかし逆に、近年の報告において JAM-A が高発現することで腫瘍の浸潤能が高まり癌患者の予後が不良となることが複数報告されている(McSherry *et al.*, 2009, Goetsch *et al.*, 2013)。この理由として JAM-A 発現が低下することで細胞遊走に関与する $\beta 1$ -integrin の発現が低下することが挙げられている(McSherry *et al.*, 2009)。これらの報告は乳癌をベースにしたものではあるが、**Fig. 3-6B** に示す通り悪性脳腫瘍組織、特に肺癌由来の転移性脳腫瘍における JAM-A 発現量は非腫瘍脳組織と比較して高いこと、また、GBM は浸潤能が非常に高いという性質を有していることから GBM に関しても同様のメカニズムが関与している可能性はある。このように JAM-A は腫瘍の浸潤に関与している可能性があり、悪性脳腫瘍組織(特に転移性脳腫瘍)において高発現していることから、JAM-A は分子標的療法における今後の標的分子となる可能性がある。実際に JAM-A を標的とした抗体が腫瘍の増殖を抑制したという報告が近年なされており(Goetsch *et al.*, 2013)、GBM において JAM-A が治療の標的となる可能性は十分にあると考えられる。

同一患者の初発時および再発時における膜タンパク質発現変動について

Fig. 3-7 に示す通り、同一患者の初発時および再発時におけるタンパク質の発現変動を解析したところ、多くは 2 倍以内の発現変動であることが認められた。その一方で、2 倍以上再発時に up-regulation される分子や down-regulation される分子も認められた。例えば、GBM89 における EGFR 発現が 130 fmol/ug protein であったのに対し、再発後の Rec51 では 3.74 fmol/ug protein と再発前の 2.87%にまで発現量が低下してしまった例も認められた(**Fig. 3-7E, Table 3-2**)。しかし、今回の結果から再発時に多くの患者で共通した変動を示す分子は特に存在せず、過去の報告においても再発時における分子変動に関しては報告間で一致した結

果とはなっていない(Berens *et al.*, 1996, Stark *et al.*, 2003, Puputti *et al.*, 2006)。また、初発組織摘出時から再発組織摘出を行う間には、通常放射線療法や化学療法を行っていることが多い。過去の報告では放射線照射によって EGFR 発現量が増加することが認められており、放射線照射に加えて temozolomide 処理によってトランスポーターの発現も変動することが認められている(Trog *et al.*, 2005, Fedrigo *et al.*, 2011)。今回解析を行った各患者において発現変動が認められた分子は放射線療法や temozolomide 投与による影響である可能性もある。このように、同一患者であっても再発後に各膜タンパク質の発現変動が認められる例も認められたことから、再発後に分子標的療法を行う場合には可能であれば再発後組織における膜タンパク質発現情報に基づいて行うことが望ましいと考えられる。また、特に膜マーカートンパク質である Na^+/K^+ ATPase の発現量は **Fig. 3-7** に示す患者全てで 2 倍以内の発現変動であった。同じバックグラウンドの組織であると考えられる同一患者の初発時および再発時の組織において Na^+/K^+ ATPase の発現が同程度であったことから、これら各組織から調製した細胞膜画分の純度には問題は無いと考えられる。一方で、**Fig. 3-1** に示す通り今回解析を行った検体において組織量と細胞膜画分回収量との間に相関性は認められないが、これは各摘出組織の状態が患者ごとに異なっていたからであると考えられる。

同一患者の腫瘍部位および非腫瘍部位における膜タンパク質発現について

前述した通り、悪性脳腫瘍組織の細胞膜上における分子標的薬標的分子や ABC トランスポーターの発現は非腫瘍脳組織と比較して up-regulation していることが認められた。これは本研究で解析を行った全ての検体の傾向として認められたことであるが、一方で、同一患者の腫瘍部位と正常部位での各膜タンパク質の発現に関しても解析を行った(**Fig. 3-8**)。同一患者の正常部位と比較して腫

瘍部位において2倍以上 up-regulation している分子が多く認められ悪性脳腫瘍組織全体の傾向と一致した。しかし、low-grade glioma である DA27 (WHO grade II) においては該当正常脳組織である NB40 と比較して大きな発現変動は認められなかったことから(Fig. 3-8G)、悪性脳腫瘍の grade が高いほど正常脳組織との膜タンパク質発現量の up-regulation が認められることが示唆された。

GBM 検体における膜タンパク質発現量と予後指標との関係について

これまでに、EGFR や PDGFR α , c-kit などの遺伝子増幅が認められた GBM を含む悪性脳腫瘍患者は予後不良となることが報告されている(Shinojima *et al.*, 2003, Puputti *et al.*, 2006)。しかし、一方で glioma 全体では EGFR 遺伝子増幅が認められるほど予後が不良であるが、GBM 患者に限ると EGFR 遺伝子の増幅に関わらず予後の違いは認められないとの報告もされている(Diedrich *et al.*, 1995)。また、免疫染色による PDGFR α および PDGFR β のタンパク質発現と GBM 患者の生存率との間に相関性は認められないという報告もされている(Haberler *et al.*, 2006)。このように、これまでの報告で分子標的薬標的分子発現と予後との関係性について統一した見解が得られていないため、GBM 組織の細胞膜上における各膜タンパク質のタンパク質レベルでの絶対発現量と予後との相関性を解析したが、発現量と予後との間に高い相関性の認められる分子は存在しなかった (Table 3-4)。

同一患者の MRI 造影および非造影領域における膜タンパク質発現について

分子標的薬を含めた抗癌剤の薬効を考えるにあたり、悪性腫瘍の heterogeneity に関しても着目する必要がある。悪性脳腫瘍の腫瘍中心部位では血液脳関門が破綻していることが報告されている(Long, 1970, Jain *et al.*, 2007)。しかし、悪性脳腫瘍の腫瘍周辺部位は MRI 非造影領域となっており、この領域では造影剤

であるガドリニウムが血管外へ漏出していないと考えられる。そのため、悪性脳腫瘍の腫瘍周辺部位は血液脳関門が完全には破綻していない可能性があり、抗癌剤が腫瘍部位に到達していない可能性がある。従って、抗癌剤薬効を考えるうえで、MRI 非造影領域での膜タンパク質発現についても考慮に入れる必要があると考えられる。そこで、同一患者の MRI 造影領域および非造影領域における膜タンパク質発現量の比較解析を行った(**Fig. 3-9**)。結果、分子標的薬の標的分子である EGFR に関しては MRI 造影に関わらずほぼ同程度の発現であり、分子標的薬のターゲット分子発現に関しては MRI 造影に影響を受けない可能性がある。また、MRI 非造影領域において血液脳関門が完全には破綻していないと仮定すると、MDR1, BCRP, claudin5 などの血液脳関門に発現している分子の発現量は MRI 非造影領域(Rec53/MRI-)で高いと予想されたが、これら分子は MRI 造影領域(Rec53/MRI+)において 2 倍以上高い発現量であることが認められた。これらの分子は脳毛細血管内皮細胞に発現していることから、MRI 造影領域の組織検体(Rec53/MRI+)における血管密度が高かったことで予想に反する結果になった可能性が原因の一つとして考えられる。従って、腫瘍組織全体のみではなく、腫瘍血管における膜タンパク質の発現解析を行うことも抗癌剤薬効の個人差を明らかにするうえで重要であると考えられる。

以上、第 3 章の結論として、悪性脳腫瘍組織における複数膜タンパク質の同時絶対定量を行うことで、複数の増殖因子受容体が悪性脳腫瘍における分子標的治療のターゲット候補分子となり得ることが認められた。また、発現している分子の種類のみならず、分子標的薬標的分子やトランスポータータンパク質の細胞膜上での発現量には非常に大きな個人差が存在することも認められた。従って、これらの膜タンパク質発現の個人差が薬剤感受性変動の要因となっていると考えられ、悪性脳腫瘍に対する個別化治療の必要性が示唆された。また、

MCT1, MCT4, JAM-A などが悪性脳腫瘍の浸潤能に関与している可能性があり、これらのタンパク質が新しい創薬ターゲット候補となる可能性がある。これらの知見は定量的標的プロテオミクスの手法に基づく悪性脳腫瘍における複数膜タンパク質の同時絶対定量が悪性脳腫瘍の今後の効果的な治療法の確立に新たな可能性を切り開くと考えている。

なお、本研究の結果から悪性脳腫瘍患者に対して有効であると考えられる分子標的薬を選択し、個別化分子標的療法を行った症例を紹介する。悪性髄膜腫(退形成髄膜腫)組織検体である AM2 は PDGFR β (2.16 fmol/ μ g protein)の発現が認められた(**Table 3-2**)。 **Table 3-3** に示すように PDGFR β 発現の中央値は定量限界以下、さらに全ての悪性脳腫瘍組織検体の中での PDGFR β 発現陽性率は 9.76%であることから、この患者は PDGFR β が高発現しているまれな症例であることが認められた。AM2 は術後 3 か月で再発し、放射線治療も効果がみられず髄腔内播種をきたした患者である。手術および放射線治療は不可能であり化学療法による治療を検討していたが、確立した化学療法が無い状況であった。Sunitinib は PDGFR β や VEGFR などを標的分子とする多標的分子標的薬であり、imatinib 抵抗性の消化管間質腫瘍、および根治切除不能または転移性の腎細胞癌の治療に適応が認められている(Sulkes, 2010)。そこで、本定量結果を基に金沢大学医学系研究科の倫理委員会承認のもと sunitinib (Sutent[®])を用いた臨床試験を金沢大学大学院医学系研究科 脳・脊髄機能制御学 濱田潤一郎 教授および中田光俊 講師によって実施された。Sunitinib を 1 日 1 回 25 mg を 28 日間連日経口投与したところ、sunitinib の投与を開始して 2 週間で MRI 上において腫瘍組織の十分な壊死が認められた(Yoshikawa *et al.*, 2012)。この症例における臨床試験の結果から、膜タンパク質定量解析結果に基づく個別化分子標的療法が有効であることが示された。

第4章 悪性脳腫瘍 xenograft における分子標的薬感受性に対する膜タンパク質発現量の影響

第1節 序論

現在、腫瘍細胞の分子標的薬への感受性解析には主に *in vitro* 系培養細胞株が使用されている。しかし、*in vitro* 系培養細胞株は実際の *in vivo* ヒト悪性腫瘍組織の性質を完全には反映しておらず、ヒト悪性腫瘍の薬剤感受性を解析するための最適なモデルとは言い難い。米国 Mayo Clinic ではヒト GBM 患者から摘出した GBM 組織をヌードマウスへと接種することで GBM xenograft line を作成することに成功している(Carlson *et al.*, 2011)。この GBM xenograft line を用いることで *in vitro* 系培養細胞株と比較してよりヒト *in vivo* を反映した解析を行うことが可能になると考えられ、実際に GBM xenograft line の薬剤感受性と発現分子との比較解析も複数行われている(Sarkaria *et al.*, 2007, Yang *et al.*, 2008)。従って、定量的標的プロテオミクスを用いて複数の膜タンパク質の絶対発現量を得ることでより正確な薬剤感受性と発現分子との比較解析ができると考えられ、GBM 治療における薬剤選択の幅を拡大することが期待される。

本研究で用いた 6 種類の GBM xenograft line の検体情報を **Table 4-1** に示す。なお、これらの検体に関しては米国 Mayo Clinic, Department of Radiation Oncology の Jann N. Sarkaria, M.D. から提供を受けた。それぞれの検体において MGMT (O^6 -methylguanine-DNA-methyltransferase) プロモーター領域のメチル化状態、EGFR および PTEN のタンパク質発現(western blotting)、4 種類の抗癌剤 (temozolomide, bevacizumab, erlotinib, everolimus) に対する感受性がすでに明らかとなっている。なお、抗体医薬である bevacizumab 以外の 3 種類の抗癌剤 (temozolomide, erlotinib, everolimus) に関しては **Fig. 4-1** にそれぞれの構造式を示した。

現在、GBM に対する化学療法的第一選択薬としてアルキル化剤である temozolomide が使用されており、temozolomide は GBM 治療において放射線療法との併用で初めて放射線療法単独時と比較して優れた効果を示した薬剤である (Stupp *et al.*, 2005)。これまでの報告で MGMT プロモーター領域のメチル化症例では temozolomide 感受性となることが分かっており、MGMT のメチル化状態は実際の臨床での temozolomide に対する効果の予測に用いられている (Hegi *et al.*, 2005)。今回の 6 検体においても、MGMT メチル化が認められる検体 (MayoGBM8, MayoGBM12, MayoGBM22, MayoGBM39) は temozolomide 感受性であり、これらの検体に対しては first line の治療が有効であることになる (Table 4-1)。しかし、一方で MayoGBM6 および MayoGBM10 に関しては temozolomide に対する効果が認められないため、早急にその他の治療法を行う必要性がある。特に、MayoGBM6 に関しては Table 4-1 に示した抗癌剤全てに対して耐性であるため、定量的標的プロテオミクスによる膜タンパク質発現解析を行うことで分子標的療法のターゲット候補分子を同定し、その分子に対する分子標的薬を用いた化学療法を行うことが重要な課題である。さらに、MayoGBM6 以外の検体に関しても Table 4-1 で感受性を示している薬剤の投与を続けた結果耐性化し腫瘍が再発する可能性も否定できない。従って、再発後に有効な分子標的療法の提案を行うためにも、分子標的療法のターゲット候補分子を同定することは重要であると考えられる。

また、近年再発 GBM に対する治療薬として VEGF に対する抗体医薬である bevacizumab が適応となり、GBM に対して初めて適応となった分子標的薬として使用されている (Bai *et al.*, 2011, Agnihotri *et al.*, 2013)。しかし、bevacizumab は直接の標的である VEGF の発現に基づいて投与されている訳では無く、今回用いた 6 検体においても耐性検体が存在する (Table 4-1)。従って、より効率的な bevacizumab 療法を考えた場合、膜タンパク質等の発現量から bevacizumab 感受

性個人差の原因となり得る因子を明らかにすることが必要であると考えられる。

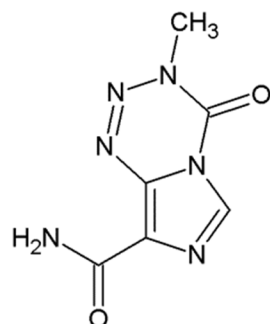
第3章の結果から、GBM 検体において EGFR が高頻度に発現しており個人差も非常に大きいことが認められたため、GBM に対する新たな分子標的療法のターゲットとして EGFR が一つの選択肢として挙げられる。今回用いた 6 検体は EGFR に対する分子標的薬である erlotinib に対する感受性が明らかとなっているため(**Table 4-1**)、erlotinib 感受性個人差に関与する因子を明らかにすることで erlotinib を用いた化学療法の可能性を高めることができると考えられる。

従って、本章では、米国 Mayo Clinic から提供して頂いた GBM xenograft line を用いて複数膜タンパク質の発現解析を行い、分子標的療法のターゲット候補分子を同定することを目的とした。また、膜タンパク質発現量と抗癌剤感受性との比較解析を行うことで、抗癌剤感受性変動の要因を解明することも目的とした。なお、本研究は東北大学大学院薬学研究科および米国 Mayo Clinic の倫理委員会の承認のもと行った。

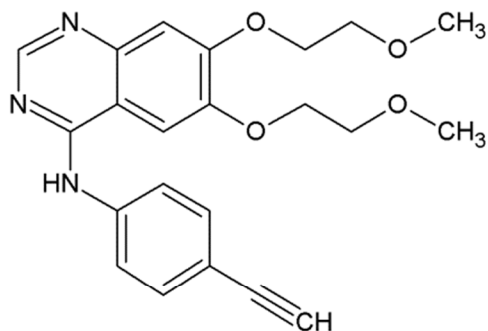
Table 4-1 Sample information of each GBM xenograft line

	Mayo GBM6	Mayo GBM8	Mayo GBM10	Mayo GBM12	Mayo GBM22	Mayo GBM39
<i>Expression status</i>						
MGMT methylation	-	+	-	+	+	+
EGFR	+	+	-	+	-	+
PTEN	+	-	-	+	+	+
<i>Sensitivity to drugs (Sen.: sensitive, Res.: resistant)</i>						
Temozolomide (Alkylating agent)	Res.	Sen.	Res.	Sen.	Sen.	Sen.
Bevacizumab (VEGF inhibitor)	Res.	Sen.	Sen.	Sen.	Res.	Res.
Erlotinib (EGFR inhibitor)	Res.	Res.	Res.	Sen.	<i>No data</i>	Sen.
Everolimus (mTOR inhibitor)	Res.	Res.	Sen.	Res.	Sen.	Res.

**A. Temozolomide
(Alkylating agent)**



**B. Erlotinib
(EGFR inhibitor)**



**C. Everolimus
(mTOR inhibitor)**

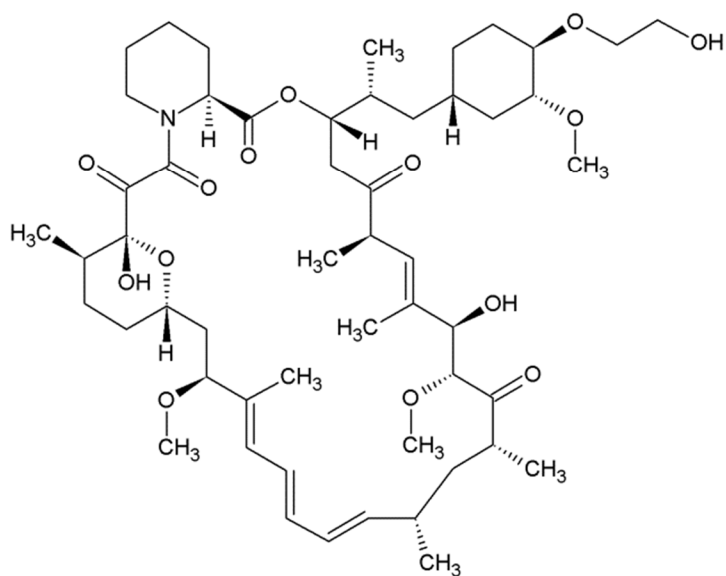


Fig. 4-1 Structure of three anticancer drugs (temozolomide, erlotinib, everolimus)

第2節 結果

4-2-1. 悪性脳腫瘍 xenograft における膜タンパク質発現

定量的標的プロテオミクスの手法を用いた複数膜タンパク質の絶対発現量解析を行うに先立ち、**Table 4-1** に示した 6 症例の GBM xenograft line から摘出した組織検体から plasma membrane fraction を調製した。ホモジナイズ法によって組織破碎を行った後にスクロース密度勾配遠心法(第 8 章 実験方法参照)を用いて湿重量 427-694 mg (平均 590 mg)の組織検体から 159-501 μg protein (平均 329 μg protein)の plasma membrane fraction を得た。

本章の研究では、15 種類の分子標的薬標的分子あるいはその候補分子、4 種類の APC トランスポーター、細胞膜マーカー分子(Na^+/K^+ ATPase)を発現解析の対象分子とした。各組織検体から調製した plasma membrane fraction を用いてこれら膜タンパク質の発現解析を行った結果、EGFR, PDGFR α , PDGFR β , ERBB2, MRP1, MRP4, BCRP, Na^+/K^+ ATPase の発現が認められた(**Table 4-2**)。なお、**Table 4-2** で*を付けた定量値は各測定で設定した 4 つの SRM/MRM transition のうち 2 つの SRM/MRM transition でピークが検出されたものであり、信頼性に劣る定量値として記載している。また、EGFR, MRP1, MRP4 に加え、細胞膜マーカータンパク質である Na^+/K^+ ATPase に関しては全ての検体で発現が認められた(**Table 4-2**)。

第 3 章の結果で GBM 組織検体において高頻度で発現が認められた EGFR に関しては、解析を行った 6 検体の GBM xenograft line 全てにおいて発現が認められ、6 検体間での発現量差は 33.4 倍(7.33-245 fmol/ μg protein)であった(**Table 4-2**)。EGFR 以外の分子標的薬標的分子としては PDGFR α , PDGFR β , ERBB2 の発現が認められた。PDGFR α は MayoGBM22 を除く 5 種類の検体で発現が認められ、その中でも MayoGBM12 は 8.30 ± 0.37 fmol/ μg protein と最も高発現していること

が認められた(**Table 4-2**)。さらに、PDGFR β は 3 検体、ERBB2 は 4 検体の GBM xenograft において発現が認められたが、これら PDGFR α , PDGFR β , ERBB2 に関しては絶対発現量としては EGFR と比較すると低い値であった。ABC トランスポータータンパク質に関しては MDR1 を除いた 3 分子(MRP1, MRP4, BCRP)の発現が認められた。MRP1, MRP4, BCRP の検体間における発現量に大きな個人差は認められなかったが、MayoGBM22 のみ MRP1 が他の検体と比較して比較的高発現(4.19 ± 0.26 fmol/ μ g protein)していた(**Table 4-2**)。

Table 4-2 Expression of membrane proteins in plasma membrane fraction of six GBM xenograft lines

	Quantitative value in plasma membrane fraction (fmol/ μ g protein)					
	MayoGBM6	MayoGBM8	MayoGBM10	MayoGBM12	MayoGBM22	MayoGBM39
Target proteins for molecular-targeted drugs						
EGFR-all	76.5 \pm 0.9	245 \pm 5	7.33 \pm 0.49	21.0 \pm 1.1	10.0 \pm 1.2	161 \pm 9
EGFR-WT,v2~5 (A)	80.8 \pm 2.1	227 \pm 6	10.6 \pm 0.2	32.5 \pm 1.3	13.7 \pm 0.3	167 \pm 2
EGFR-WT,v245 (B)	7.15 \pm 0.45	167 \pm 2	11.0 \pm 0.4	25.9 \pm 1.0	12.1 \pm 0.9	10.5 \pm 1.1
EGFRvIII (= A - B)	73.7	59.3	- **	6.57	1.60	157
EGFR L858R Wild type	53.4 \pm 2.2	154 \pm 5	5.96 \pm 0.23	18.0 \pm 1.0	7.15 \pm 0.49	111 \pm 5
EGFR L858R Mutant	U.L.Q. (<0.0174)	U.L.Q. (<0.0175)	U.L.Q. (<0.0181)	U.L.Q. (<0.0217)	U.L.Q. (<0.0162)	U.L.Q. (<0.0192)
PDGFR α	3.62 \pm 0.37	0.412 \pm 0.108 *	1.10 \pm 0.20	8.30 \pm 0.37	U.L.Q. (<0.0781)	0.412 \pm 0.041
PDGFR β	0.748 \pm 0.141 *	U.L.Q. (<0.112)	1.77 \pm 0.09	U.L.Q. (<0.108)	1.60 \pm 0.19	U.L.Q. (<0.131)
ERBB2	0.568 \pm 0.089 *	0.847 \pm 0.019 *	0.973 \pm 0.111	U.L.Q. (<0.342)	0.409 \pm 0.053 *	U.L.Q. (<0.383)
VEGFR1	U.L.Q. (<0.0933)	U.L.Q. (<0.0846)	U.L.Q. (<0.0827)	U.L.Q. (<0.102)	U.L.Q. (<0.0934)	U.L.Q. (<0.102)
VEGFR2	U.L.Q. (<0.515)	U.L.Q. (<0.516)	U.L.Q. (<0.483)	U.L.Q. (<0.477)	U.L.Q. (<0.488)	U.L.Q. (<0.532)
FLT3	U.L.Q. (<0.0421)	U.L.Q. (<0.0406)	U.L.Q. (<0.0421)	U.L.Q. (<0.0402)	U.L.Q. (<0.0430)	U.L.Q. (<0.0438)
CD33	U.L.Q. (<0.121)	U.L.Q. (<0.0958)	U.L.Q. (<0.0548)	U.L.Q. (<0.114)	U.L.Q. (<0.125)	U.L.Q. (<0.123)
CD37	U.L.Q. (<0.336)	U.L.Q. (<0.334)	U.L.Q. (<0.342)	U.L.Q. (<0.325)	U.L.Q. (<0.365)	U.L.Q. (<0.343)
c-kit	U.L.Q. (<0.271)	U.L.Q. (<0.285)	U.L.Q. (<0.261)	U.L.Q. (<0.271)	U.L.Q. (<0.247)	U.L.Q. (<0.247)
ABC transporter proteins						
MDR1	U.L.Q. (<0.0416)	U.L.Q. (<0.0406)	U.L.Q. (<0.0391)	U.L.Q. (<0.0323)	U.L.Q. (<0.0426)	U.L.Q. (<0.0434)
MRP1	0.669 \pm 0.034 *	0.261 \pm 0.074 *	0.747 \pm 0.058	1.41 \pm 0.04	4.19 \pm 0.23	0.764 \pm 0.119 *
MRP4	0.833 \pm 0.017 *	0.371 \pm 0.033	0.891 \pm 0.060	0.972 \pm 0.050 *	0.794 \pm 0.034	0.902 \pm 0.017
BCRP	1.64 \pm 0.07	1.47 \pm 0.03	0.899 \pm 0.011 *	1.45 \pm 0.07	U.L.Q. (<0.192)	0.736 \pm 0.022 *
Membrane marker proteins						
Na ⁺ /K ⁺ ATPase	50.1 \pm 1.4	66.9 \pm 2.9	30.4 \pm 1.5	36.0 \pm 1.3	63.8 \pm 1.3	43.6 \pm 1.1

Plasma membrane fraction of GBM xenograft lines (MayoGBM6, GBM8, GBM10, GBM12, GBM22, GBM39) were analyzed by multiplexed-SRM/MRM analysis using LC-MS/MS. The expression amount of each molecule was determined as the average of two to four quantitative values from four SRM/MRM transitions of one analysis. Each value represents the mean \pm S.E.M. (n=2-8 SRM/MRM transitions). U.L.Q. means “under limit of quantification” and the value in brackets following U.L.Q. represents the value of the quantification limit (fmol/ μ g protein). *The reliability of the calculated values was considered to be lower than other detected molecules, since only two among four SRM/MRM transitions gave the detectable peaks over 5,000 counts. **Quantitative value under zero

4-2-2. 悪性脳腫瘍 xenograft における EGFR 変異体発現

第3章の結果から、GBM 検体において EGFR が高頻度に発現しており個人差も非常に大きいことが認められたが、その発現量と予後指標との間に相関性は認められなかった(**Table 3-4**)。EGFR の細胞外領域の一部である exon2-7 を欠失した splicing variant である EGFRvIII は GBM 患者の 27%において発現が認められ、EGFRvIII を発現している GBM 患者は EGFRvIII の発現が認められない患者と比較して予後が不良であることが報告されている(Biernat *et al.*, 2004)。また、EGFR に対する分子標的薬である erlotinib に対して感受性となるためには少なくとも EGFRvIII の発現が必要であるとの報告もされている(Mellinghoff *et al.*, 2005)。そこで、erlotinib 感受性を考えるにあたり EGFRvIII に関しても定量対象に含める必要があると考えられたが、**第8章 実験方法**に示すペプチド選択クライテリア(**153 ページ**)に基づいた場合、EGFRvIII 特異的に認識するペプチドプローブの設計は行えなかった。従って、以下に示す方法で EGFRvIII の発現量を間接的に測定した。まずは、①EGFR wild type および EGFRvII~V を認識するペプチドプローブである EGFR-WT,vII~V、そして EGFR wild type および EGFRvII, IV, V を認識するペプチドプローブである EGFR-WT,vII,IV,V それぞれを用いて定量値を算出し、②以下に示す式に基づき間接的に EGFRvIII の定量値を算出することとした。

$$\text{EGFRvIII} = (\text{EGFR-WT,vII~V の定量値}) - (\text{EGFR-WT,vII,IV,V の定量値})$$

これら EGFRvIII 定量用ペプチドの発現解析を行った結果、EGFR-WT,vII~V および EGFR-WT,vII,IV,V とともに 6 検体全ての GBM xenograft line で発現が認められた(**Table 4-2**)。これら 2 つのペプチドプローブを用いて EGFRvIII の発現量を算出した結果、MayoGBM10 を除いて EGFRvIII が発現していることが認められ

た(**Table 4-2**)。EGFRvIII の発現が認められた検体の中では、EGFRvIII の発現量は 1.60~157 fmol/μg protein と大きな検体差が認められた(**Table 4-2**)。また、EGFR-all 発現量に対する EGFRvIII 発現量の比を求めることで、EGFRvIII の EGFR 全体の発現量に占める割合を算出した。**Table 4-3** に示す通り、MayoGBM6 および MayoGBM39 に関しては EGFR-all 発現に対する EGFRvIII の発現割合がそれぞれ 96.3%および 97.5%であり、発現している EGFR のほぼ全量が EGFRvIII であることが認められた。一方で、MayoGBM8, MayoGBM12, MayoGBM22 の 3 検体に関しては EGFRvIII の発現割合が 16.0~31.4%であり、EGFRvIII の EGFR 全体に占める割合は MayoGBM6 および MayoGBM39 と比較して低いことが示唆された(**Table 4-3**)。また、MayoGBM10 に関しては 2 つのペプチドプローブの差がマイナスの値となったことから EGFRvIII の発現は認められないと考えられた。

Table 4-3 Expression ratio of EGFRvIII to EGFR-all in plasma membrane fraction of six GBM xenograft lines

	Quantitative value (fmol/ug protein)		Expression ratio (%)
	EGFR-all	EGFRvIII	(EGFRvIII/EGFR-all)
MayoGBM6	76.5 ± 0.9	73.7	96.3
MayoGBM8	245 ± 5	59.3	24.2
MayoGBM10	7.33 ± 0.49	- *	- *
MayoGBM12	21.0 ± 1.1	6.57	31.4
MayoGBM22	10.0 ± 1.2	1.60	16.0
MayoGBM39	161 ± 9	157	97.5

Plasma membrane fraction of GBM xenograft lines (MayoGBM6, GBM8, GBM10, GBM12, GBM22, GBM39) were analyzed by multiplexed-SRM/MRM analysis using LC-MS/MS. The expression amount of each molecule was determined as the average of two to four quantitative values from four SRM/MRM transitions of one analysis. Each value represents the mean ± S.E.M. (n=2-8 SRM/MRM transitions). EGFRvIII = (EGFR-WT,vII~V) – (EGFR-WT,vII,IV,V), *Each value was not calculated because quantitative value of EGFRvIII was under zero.

EGFR に対する分子標的薬は前述した erlotinib に加えて gefitinib も存在する (Fig. 4-2)。これまでに非小細胞肺癌患者における gefitinib 感受性変異である EGFR 変異体として 858 番目の leucine が arginine に変異した EGFR L858R が報告されており (Paez *et al.*, 2004)、EGFR に対する分子標的薬の感受性を解析する上で重要な変異体であると考えられる。そこで、Fig. 4-3 に示すペプチドプローブを用いて GBM xenograft line における EGFR L858R の発現解析を行った。EGFR L858R を認識するペプチドプローブである EGFR L858R Mutant の発現は 6 検体全ての GBM xenograft line で認められず、wild type のみを認識する EGFR L858R Wild Type は全ての GBM xenograft line で認められた (Table 4-2)。従って、これら GBM xenograft line における EGFR L858R 発現に関しては wild type の発現であることが示唆された。

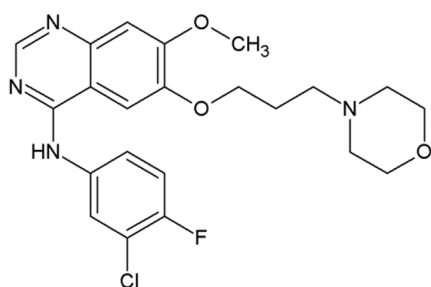


Fig. 4-2 Structure of gefitinib (EGFR inhibitor)

EGFR L858R Wild Type

>>> Peptide probe recognizing expression of EGFR L858R Wild Type (858Leucine)

858

Peptide Sequence: ITDFGLAK

EGFR L858R Mutant

>>> Peptide probe recognizing expression of EGFR L858R Mutant (858Arginine)

858

Peptide Sequence: ITDFGR

Fig. 4-3 Peptide probe for quantification of EGFR L858R

4-2-3. 悪性脳腫瘍 xenograft における膜タンパク質発現と抗癌剤感受性比較

6 検体の GBM xenograft line における EGFR 関連分子の発現 (EGFR-all および EGFRvIII 発現量、EGFRvIII 発現割合) と各種抗癌剤(erlotinib, temozolomide, everolimus, bevacizumab)に対する薬剤感受性との比較解析結果を **Fig. 4-4** に示す。耐性 GBM xenograft line と感受性 GBM xenograft line との間に有意な発現量差が認められたものは存在しなかった。しかし、有意な発現量差は認められなかったものの、everolimus (mTOR inhibitor)耐性である GBM xenograft line において EGFR および EGFRvIII が高発現している傾向が認められた。

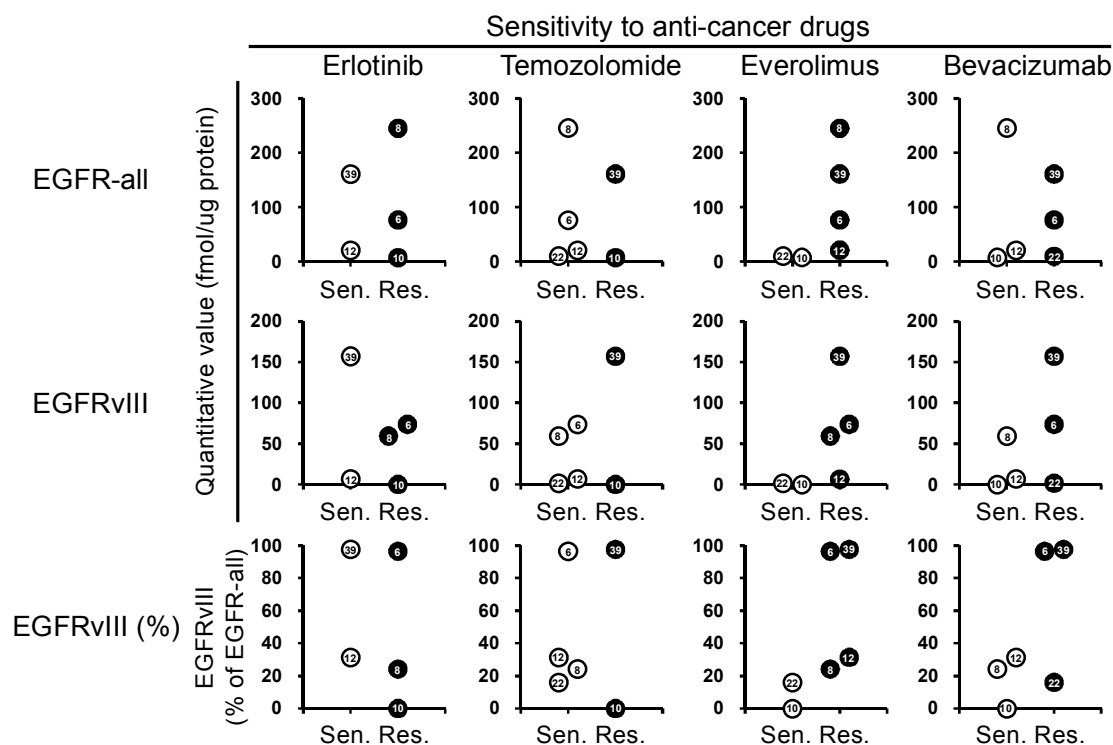


Fig. 4-4 Comparison between EGFR/EGFRvIII expression levels and sensitivity to anti-cancer drugs

Plasma membrane fraction of GBM xenograft lines (MayoGBM6, GBM8, GBM10, GBM12, GBM22, GBM39) were analyzed by multiplexed-SRM/MRM analysis using LC-MS/MS. The expression amount of each molecule was determined as the average of two to four quantitative values from four SRM/MRM transitions of one analysis. Sen.: Sensitive, Res.: Resistant.

6 検体の GBM xenograft line における PDGFR α , PDGFR β , ERBB2 の発現量と各種抗癌剤(erlotinib, temozolomide, everolimus, bevacizumab)に対する薬剤感受性と
の比較解析結果を **Fig. 4-5** に示す。耐性 GBM xenograft line と感受性 GBM
xenograft line との間に有意な発現量差が認められたものが一部存在した。
Everolimus 感受性 GBM xenograft line では耐性 GBM xenograft line と比較して
PDGFR β が有意に高発現しており、一方で、erlotinib 耐性 GBM xenograft line で
は感受性 GBM xenograft line と比較して ERBB2 が有意に高発現していた。

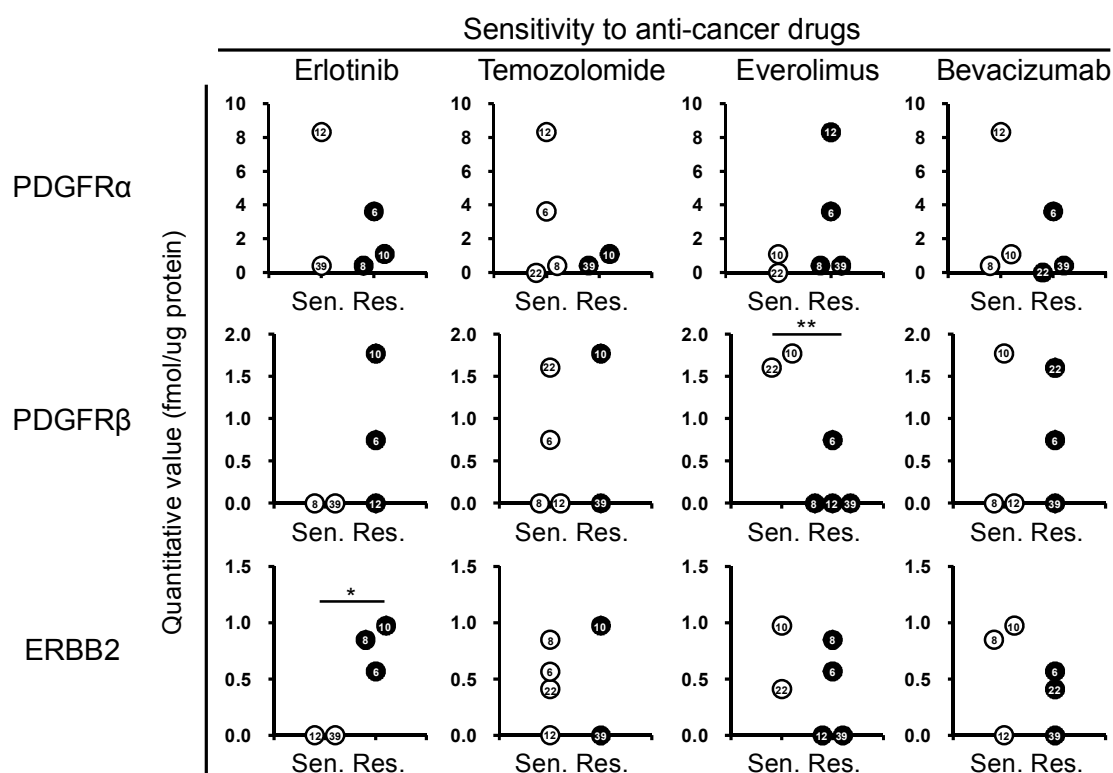


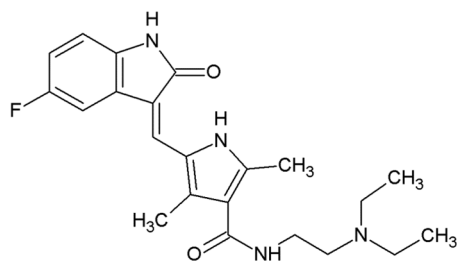
Fig. 4-5 Comparison between expression levels of membrane receptor proteins and sensitivity to anti-cancer drugs

Plasma membrane fraction of GBM xenograft lines (MayoGBM6, GBM8, GBM10, GBM12, GBM22, GBM39) were analyzed by multiplexed-SRM/MRM analysis using LC-MS/MS. The expression amount of each molecule was determined as the average of two to four quantitative values from four SRM/MRM transitions of one analysis. Sen.: Sensitive, Res.: Resistant. *p<0.05, **p<0.01

第3節 考察

本章 第1節で述べた通り、MayoGBM6 に関しては temozolomide, bevacizumab, erlotinib, everolimus のいずれの抗癌剤に対しても耐性であることが分かっている (Table 4-1)。他の GBM xenograft line はそれぞれ少なくとも1種類は感受性である抗癌剤が存在するため、これらの xenograft line に対する第一選択薬は少なくとも決定できると考えられる。しかし、Table 4-1 の情報のみでは MayoGBM6 に対して感受性を示す抗癌剤の選択はできず、化学療法が行えない可能性がある。そこで、Table 4-2 に示す膜タンパク質発現解析結果に基づき分子標的薬の選択ができるかどうかを考察した。Table 4-2 に示す通り、MayoGBM6 の plasma membrane fraction において EGFR の他に PDGFR α , PDGFR β , ERBB2 の発現が認められた。これら受容体タンパク質の中でも特に PDGFR α に関しては高発現 (3.62 ± 0.37 fmol/ug protein) が認められ、PDGFR α に対する分子標的薬である sunitinib および sorafenib が MayoGBM6 に対して有効である可能性がある。なお、sunitinib および sorafenib は PDGFR α など多数の標的分子を有する多標的阻害薬であり、その構造式を Fig. 4-6 に示す。このように、定量的標的プロテオミクスを用いて複数の受容体タンパク質等の発現解析を行うことによって、分子標的薬選択の幅の拡大が行えることが示唆された。

A. Sunitinib



B. Sorafenib

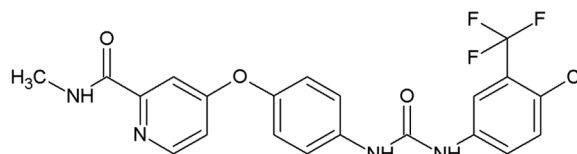


Fig. 4-6 Structure of sunitinib and sorafenib

近年再発 GBM に対して分子標的薬である bevacizumab が適応され、GBM に対する初の分子標的薬として注目されている。これまでに、bevacizumab 臨床試験において irinotecan との併用で無増悪生存期間を延長させることが報告されている(Bai *et al.*, 2011, Agnihotri *et al.*, 2013)。この bevacizumab は VEGF に対する抗体医薬であり、VEGF を中和することで VEGFR を介した増殖シグナル (血管新生シグナル)を阻害することで抗腫瘍増殖効果を発揮することが知られている。そのため、bevacizumab 感受性となるには少なくとも VEGFR の発現が必要であると考えられたが、今回発現解析を行った 6 種類全ての GBM xenograft line plasma membrane fraction において、VEGFR1 および VEGFR2 の発現はともに定量限界以下であった(**Table 4-2**)。これまでの報告では、VEGFR1 および VEGFR2 の発現が認められた GBM 患者のうち一部の患者では腫瘍血管のみに発現が認められ、他の患者では腫瘍血管だけではなく腫瘍細胞本体でも発現が認められている(Steiner *et al.*, 2004)。従って、今回解析を行った検体における VEGFR の発現が腫瘍血管のみに発現していた場合、腫瘍全体から調製した plasma membrane fraction では VEGFR の検出が困難である可能性がある。この場合、まず腫瘍組織から腫瘍血管を単離し、さらに単離した血管から plasma membrane fraction を調製する必要がある。また、bevacizumab の直接の標的分子は VEGF であるため、これらの検体における VEGF の発現解析をすることによって bevacizumab 感受性に対する VEGF の関与を明らかにすることもできると考えられる。また、**Fig. 4-4** および **Fig. 4-5** に示す通り今回発現が認められた EGFR, PDGFR α , PDGFR β , ERBB2 発現量に関してはそれぞれ bevacizumab 感受性と相関性を示さないが、これらの分子は VEGF を起点とするシグナルに直接関与する分子ではないことから相関性を示していないと考えられる。

第 3 章の結果から、悪性脳腫瘍患者から摘出した組織検体において EGFR が高頻度で発現していることが認められており、悪性脳腫瘍患者に対する分子標

的療法の主なターゲット分子として EGFR が挙げることができると考えられる。**Table 4-1** に示す通り、GBM xenograft line のうち MayoGBM10 および MayoGBM22 は western blot 法によって EGFR 発現が陰性であり、その他の MayoGBM6, MayoGBM8, MayoGBM12, MayoGBM39 は EGFR 発現が陽性であることが報告されている(Sarkaria *et al.*, 2007)。**Table 4-2** に示す通り、western blot 法で EGFR 陰性となった群と比較して EGFR 陽性となった群では EGFR 絶対発現量が高い傾向にあることが認められた。また、MayoGBM10 および MayoGBM22 に関しては western blot 法では陰性となっていたが、本研究の解析から EGFR 陽性群 (western blot 法)と比較して低い発現ではあるが EGFR の発現は認められた。さらに、GBM10 における EGFR 発現量は 7.33 ± 0.49 fmol/ μ g protein であり、GBM22 は 10.0 ± 1.2 fmol/ μ g protein となっていることから、Western blotting で陰性と判断された xenograft line においても LC-MS/MS を用いることによって定量値を算出可能であることが示された。一方で、western blot 法での EGFR 陽性群に関しては LC-MS/MS を用いた解析結果から検体間の EGFR 発現量に 11.7 倍(21.0~245 fmol/ μ g protein)もの検体間差が認められ、LC-MS/MS を用いることで検体間の発現量差をより詳細に求めることができることが示唆された。

前述した通り、第 3 章の結果から悪性脳腫瘍患者に対する分子標的療法の主なターゲット分子として EGFR が挙げられたため、EGFR に対する分子標的薬である erlotinib 感受性と EGFR 発現量との比較解析を行った。Erlotinib は EGFR の tyrosine kinase inhibitor (TKI)であり、erlotinib が薬効を示すためには少なくとも EGFR の発現が認められる必要がある。解析を行った 6 種類の GBM xenograft line 全てにおいて EGFR の発現は認められたが、MayoGBM10 に関しては 6 検体の中で最も EGFR 発現量が低く (7.33 ± 0.49 fmol/ μ g protein)、さらに EGFRvIII の発現は認められなかった(**Table 4-2**)。MayoGBM10 は erlotinib に対して耐性であり、これは EGFR が他の検体と比較して低発現していることが erlotinib の薬効が認

められない原因の一つであると考えられる。

しかし一方で、**Table 4-2** に示す通り MayoGBM6 および MayoGBM8 は EGFR および EGFRvIII が高発現しているにも関わらず erlotinib に対して耐性となっている。従って、MayoGBM6 および MayoGBM8 に関しては EGFR および EGFRvIII 以外に erlotinib 耐性となるような因子が関与していると考えられる。これまでに GBM 患者において EGFRvIII および PTEN の共発現が erlotinib 感受性に関与することが報告されている(Uribe and Gonzalez, 2011)。がん抑制タンパク質である PTEN は EGFR などの増殖因子受容体下流シグナルである PI3K/Akt シグナルを down-regulation する性質を有しており、GBM 患者の一部において PTEN の欠失が認められることが報告されている(Grossmann and Samowitz, 2011)。また、*in vitro* 系の研究で、PTEN および EGFRvIII を強制発現させた U87MG 細胞は親細胞と比較して erlotinib に対して感受性となった一方で、wild type EGFR や EGFRvIII のみを強制発現させた場合は親細胞と比較して erlotinib に対する感受性に変化は認められなかったことが報告されている(Mellinghoff *et al.*, 2005)。以上の報告から、erlotinib 感受性には EGFRvIII 発現の他に PTEN の発現も必要であることが示唆されており、MayoGBM6 および MayoGBM8 における erlotinib 耐性には PTEN の欠失が関与している可能性がある。実際に、MayoGBM8 は PTEN が欠失しているため(**Table 4-1**)、MayoGBM8 は EGFRvIII が高発現しているにも関わらず erlotinib 耐性となっていると考えられる。一方で、MayoGBM6 は PTEN の発現が認められている。従って、MayoGBM6 における erlotinib 耐性には EGFRvIII および PTEN 以外の因子が関与している可能性がある。また、各検体における EGFR 全体の発現に対する EGFRvIII 発現の占める割合(**Table 4-3**)と erlotinib 感受性との関係性を検証した(**Fig. 4-4**)。Erlotinib 感受性を EGFR および EGFRvIII 発現量で説明ができない MayoGBM6 を除外して考察すると、EGFRvIII 発現量の占める割合が高い検体(MayoGBM12, MayoGBM39)で erlotinib

感受性が高いことが認められた(**Fig. 4-4**)。さらに、これら 2 検体は PTEN が発現しており、一方で EGFRvIII 発現量の占める割合が低く erlotinib 耐性である MyoGBM8 および MayoGBM10 に関しては PTEN が欠失している。従って、EGFR 全体に占める EGFRvIII 発現量の占める割合が高く、かつ PTEN が発現している検体において erlotinib 感受性が高くなると考えられる。

Erlotinib 感受性には上述した EGFRvIII および PTEN の他に、EGFR 以外の増殖因子受容体が関与しているという報告も存在する。Erlotinib を含む EGFR-TKI に対して獲得耐性を示す細胞株では MET の過剰発現やリン酸化、そして MET のリガンドである HGF の過剰発現が認められることが報告されている(Nguyen *et al.*, 2009, Rosenzweig, 2012)。さらに、EGFR-TKI 獲得耐性細胞株では IGFR を介した増殖シグナルが亢進しているという報告も存在する(Rosenzweig, 2012)。従って、MayoGBM6 では MET や IGFR を介したシグナル経路が亢進し、erlotinib で阻害された EGFR シグナル経路をバイパスすることで erlotinib 耐性となっている可能性もある。

前述したように EGFR および EGFRvIII 発現量で EGFR-TKI 感受性を一部説明できない検体が存在したが、一方で **Fig. 4-4** に示す通り EGFR 発現量と mTOR 阻害剤である everolimus 感受性との間に相関性が認められた。mTOR は serine/threonine kinase であり、PI3K/Akt/mTOR シグナル伝達経路によって腫瘍細胞の増殖や浸潤に関与していることが報告されている(Mendiburu-Elicabe *et al.*, 2012)。EGFR が活性化をすると PI3K/Akt/mTOR および MAPK シグナル経路によって腫瘍増殖が引き起こされるため、EGFR が高発現している細胞ではこれら両シグナル経路が活性化していると考えられる。Everolimus はこのうち PI3K/Akt/mTOR 経路のみ阻害を行うことから、EGFR 高発現細胞においては MAPK シグナル経路の活性化が阻害できないために everolimus に対し耐性化している可能性がある。

以上、第 4 章の結論として、GBM に対する標準治療薬に対して耐性である MayoGBM6 のケースに示す通り、GBM xenograft line における複数の膜タンパク質の発現解析を行うことで分子標的療法のターゲット候補分子を複数選択することが可能となり、第二第三の治療方針を考えるうえで有用であることが分かった。また、膜タンパク質発現量と抗癌剤感受性との比較解析を行うことで、EGFRvIII の発現割合が高く PTEN 発現が認められる検体では erlotinib に対する感受性が高くなることが認められ、EGFRvIII の発現割合が erlotinib 感受性変動の原因の一つであることが示唆された。しかし、一方で EGFRvIII の発現割合のみでは erlotinib 感受性を説明できない検体も認められたことから、EGFRvIII 発現以外の因子が erlotinib 感受性に関与している可能性がある。

第5章 LC-MS/MS を用いたリン酸化 EGFR 定量法の確立および発現解析

第1節 序論

第4章の結果から、GBM xenograft line において EGFRvIII の発現割合が erlotinib 感受性変動の原因の一つであることが示唆された。しかし、一方で EGFRvIII の発現割合のみでは erlotinib 感受性を説明できない検体も認められ、EGFRvIII 発現以外の因子が erlotinib 感受性に関与していると考えられた。

Erlotinib は EGFR の tyrosine kinase inhibitor (TKI)であり、EGFR のチロシンキナーゼ部位の ATP を競合的に阻害することで EGFR の自己リン酸化を阻害し薬効を発揮する分子標的薬である。EGFR に代表される増殖因子受容体はリガンドタンパク質が結合すると増殖因子受容体同士の二量体形成が起こり、受容体のチロシンキナーゼ活性が亢進して自己リン酸化が起こる。EGFR はこの自己リン酸化が起こると PI3K/Akt 経路や MAPK 経路などの下流シグナル経路が活性化され腫瘍増殖や浸潤等が促進されることが報告されている(Scaltriti and Baselga, 2006, Morandell *et al.*, 2008)。このように、これらの下流シグナルが亢進されるためにはまず EGFR の自己リン酸化が起こる必要があり、erlotinib 感受性個人差を考えるうえで EGFR 自己リン酸化体の発現量を考慮に入れることが望ましいと考えられる。実際に、肺癌患者において、EGFR の 1172 番目の tyrosine 残基のリン酸化(EGFR pY1172)が erlotinib 感受性と関連しているという報告もこれまでにされている(Zhang *et al.*, 2011)。

従って、本章では、複数の EGFR 自己リン酸化体を LC-MS/MS を用いて直接同時に絶対定量する手法を確立し、GBM xenograft line における erlotinib 感受性の変動に EGFR 自己リン酸化体発現量に関与しているかを明らかにすることとした。

第2節 結果

5-2-1. LC-MS/MS を用いた EGFR 自己リン酸化体定量法の確立

EGFR のリガンドである EGF が EGFR に結合するとまず EGFR 同士または他の ERBB family と二量体を形成し、その後 EGFR の自己リン酸化が起こり下流へとシグナルを伝達していく。EGFR には自己リン酸化部位が N 末端側からそれぞれ pY998, pY1016, pY1092, pY1110, pY1172, pY1197 の 6 部位存在(全て tyrosine 残基)することが報告されている。従って、これら 6 つの自己リン酸化部位を含むトリプシン消化ペプチド断片を **Fig. 5-1** に示す。

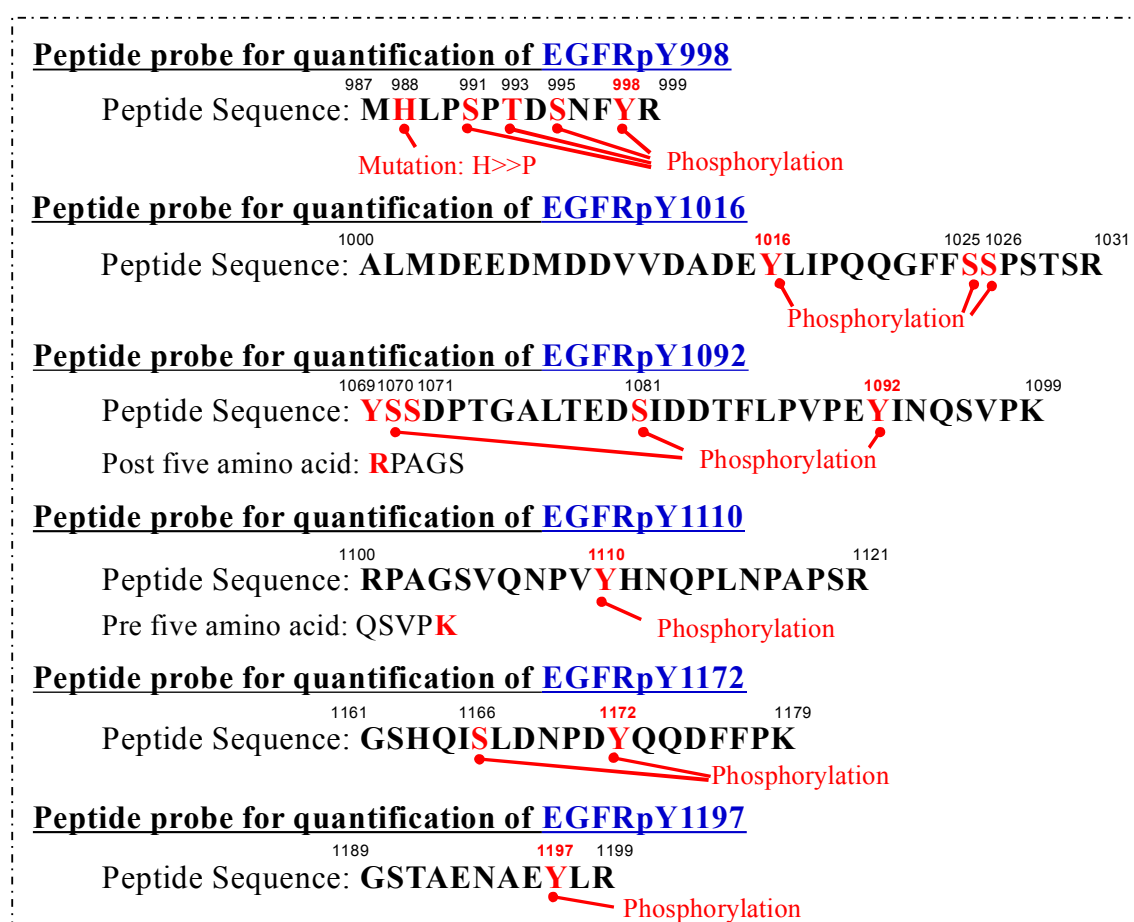


Fig. 5-1 Auto phosphorylation site of EGFR and trypsin digested peptide of EGFR

Fig. 5-1 に示した 6 つの自己リン酸化部位のうち pY1172 および pY1197 を認識するペプチド断片に関しては、LC-MS/MS 解析に際し特に問題のある配列ではないと考えられた。ただし、pY1172 を含むペプチドはその配列中にリン酸化報告のある 1166 残基目の serine (pS1166)を含んでいる(**Fig. 5-1**)。従って、リン酸化 EGFR (pY1172)の定量を行う場合、①1162 残基目の serine および 1172 残基目の tyrosine とともに非リン酸化、②1162 残基目の serine のみリン酸化、③1172 残基目の tyrosine のみリン酸化、④1162 残基目の serine および 1172 残基目の tyrosine とともにリン酸化、の 4 種類のペプチドを用いて解析する必要がある(**Table 5-1**)。従って、EGFR の 6 つの自己リン酸化部位のうち pY1172 および pY1197 を認識するペプチドに関して LC-MS/MS を用いた定量法を確立することとした。**Table 5-1** に示した pY1172 および pY1197 定量用の 6 種類のペプチドプローブに関して、それぞれペプチド標品および対応する安定同位元素標識ペプチド標品(内標準ペプチド)を購入し、以降の実験を行った。

Table 5-1 Peptide probe for quantification of phosphorylated EGFR

Peptide Name	ST/ISO	Sequence	Recognition
EGFR1172 (Non-P)	ST	GSHQISLDNPDYQQDFFPK	Non-phosphorylated peptide
	ISO	GSHQISLDNPDYQQDFFPK*	
EGFR1172 (pY1172)	ST	GSHQISLDNPD <u>p</u> YQQDFFPK	pY1172
	ISO	GSHQISLDNPD <u>p</u> YQQDFFPK*	
EGFR1172 (pS1166)	ST	GSHQI <u>p</u> SLDNPDYQQDFFPK	pS1166
	ISO	GSHQI <u>p</u> SLDNPDYQQDFFPK*	
EGFR1172 (pS1166/pY1172)	ST	GSHQI <u>p</u> SLDNPD <u>p</u> YQQDFFPK	pS1166 and pY1172
	ISO	GSHQI <u>p</u> SLDNPD <u>p</u> YQQDFFPK*	
EGFR1197 (Non-P)	ST	GSTAENAEYLR	Non-phosphorylated peptide
	ISO	GSTAENAEYLR*	
EGFR1197 (pY1197)	ST	GSTAENAE <u>p</u> YLR	pY1197
	ISO	GSTAENAE <u>p</u> YLR*	

Bold letters with asterisks indicate amino acid residues labeled with stable isotope (^{13}C and ^{15}N), and bold letters with underlines indicate phosphorylated amino acids.

なお、その他の 4 つの自己リン酸化部位に関しては設計時点の段階で測定に問題があり、LC-MS/MS 解析に適していないと考えられた。以下にそれぞれの理由を記載する。

<pY998 を認識するペプチド>

ペプチド配列中に pY998 以外のリン酸化報告部位が 3 つ(pS991, pT993, pS995) 存在する。また、988 残基目の histidine が proline へと変異することも報告されている(**Fig. 5-1**)。従って、解析すべきペプチド数が多くなってしまうので現実的には解析が困難であると考えられる。

<pY1016 を認識するペプチド>

ペプチド配列中に pY1016 以外のリン酸化報告部位が 2 つ(pS1025, pS1026) 存在する(**Fig. 5-1**)。従って、解析すべきペプチド数が多くなってしまうので現実的には解析が困難であると考えられる。

<pY1092 を認識するペプチド>

ペプチド配列中に pY1092 以外のリン酸化報告部位が 4 つ(pY1069, pS1070, pS1071, pS1081) 存在する。また、ペプチド C 末端側において KR が連続しており、トリプシン消化において目的のペプチド断片を再現性良く得ることが困難であると考えられる(**Fig. 5-1**)。

<pY1110 を認識するペプチド>

ペプチド N 末端側において KR が連続しており、トリプシン消化において目的のペプチド断片を再現性良く得ることが困難であると考えられる(**Fig. 5-1**)。

各ペプチド溶液 0.1~1 μM を質量分析装置に 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ の流速でインフュージョンし、高感度に検出される 4 種類のプロダクトイオン(Q3)、declustering potential (DP)および collision energy (CE)を最適値として選択し、イオン化条件の最適化を行った(**Table 5-2**)。EGFR 自己リン酸化部位である pY1172 および pY1197 発現解析用の 6 種類のペプチド全てにおいて、質量分析装置を用いた検出が可能であることが示唆された。

Table 5-2 Peptide probe sequences and selected ions for absolute quantification of phosphorylated EGFR

Peptide name	Peptide sequence	Standard peptide		Internal standard		DP (V)	CE (V)	Ion series (Q3)
		Q1 (<i>m/z</i>)	Q3 (<i>m/z</i>)	Q1 (<i>m/z</i>)	Q3 (<i>m/z</i>)			
EGFR1172 (Non-P)	GSHQISLDNPDYQQDFFPK*	746.0	642.8	748.7	646.8	136	31	y10 (<i>z</i> =2)
		746.0	410.2	748.7	410.2	136	47	b4 (<i>z</i> =1)
		746.0	781.4	748.7	789.4	136	31	y6 (<i>z</i> =1)
		746.0	909.5	748.7	917.5	136	29	y7 (<i>z</i> =1)
EGFR1172 (pY1172)	GSHQISLDNPD p YQQDFFPK*	772.7	682.8	775.3	686.8	86	31	y10 (<i>z</i> =2)
		772.7	410.2	775.3	410.2	86	47	b4 (<i>z</i> =1)
		772.7	391.2	775.3	399.2	86	31	y3 (<i>z</i> =1)
		772.7	523.3	775.3	523.3	86	39	b5 (<i>z</i> =1)
EGFR1172 (pS1166)	GSHQI p SLDNPDYQQDFFPK*	772.7	642.8	775.3	646.8	111	29	y10 (<i>z</i> =2)
		772.7	781.4	775.3	789.4	111	31	y6 (<i>z</i> =1)
		772.7	909.5	775.3	917.5	111	29	y7 (<i>z</i> =1)
		772.7	653.3	775.3	661.3	111	33	y5 (<i>z</i> =1)
EGFR1172 (pS1166/pY1172)	GSHQI p SLDNP Dp YQQDFFPK*	799.3	682.8	802.0	686.8	116	33	y10 (<i>z</i> =2)
		799.3	391.2	802.0	399.2	116	33	y3 (<i>z</i> =1)
		799.3	410.2	802.0	410.2	116	47	b4 (<i>z</i> =1)
		799.3	523.3	802.0	523.3	116	33	b5 (<i>z</i> =1)
EGFR1197 (Non-P)	GSTAENAEYLR*	605.8	765.4	610.8	775.4	116	31	y6 (<i>z</i> =1)
		605.8	580.3	610.8	590.3	116	29	y4 (<i>z</i> =1)
		605.8	451.3	610.8	461.3	116	33	y3 (<i>z</i> =1)
		605.8	651.4	610.8	661.4	116	31	y5 (<i>z</i> =2)
EGFR1197 (pY1197)	GSTAENAE p YLR*	645.8	845.4	650.8	855.4	131	31	y6 (<i>z</i> =1)
		645.8	731.3	650.8	741.3	131	35	y5 (<i>z</i> =1)
		645.8	660.3	650.8	670.3	131	31	y4 (<i>z</i> =1)
		645.8	531.2	650.8	541.2	131	35	y3 (<i>z</i> =1)

Typically, doubly or triply charged precursor ions were selected (Q1). Four SRM/MRM transitions per peptide, corresponding to high-intensity fragment ions, were selected. Bold letters with asterisks indicate amino acid residues labeled with stable isotope (^{13}C and ^{15}N), and bold letters with underlines indicate phosphorylated amino acids. DP: declustering potential, CE: collision energy

Table 5-2 に示す通り、EGFR1172 (pY1172)およびEGFR1172 (pS1166)はペプチド断片内におけるリン酸化部位は異なるものの、リン酸化による質量増加分は同一のため Q1 の値がともに標準ペプチド(ST)で $m/z=772.7$ 、安定同位元素標識ペプチド(ISO)で $m/z=775.3$ となっている。従って、これら 2 つのペプチド断片は Q1 において質量分離をすることが不可能であるため、Q3 において m/z の値が異なるプロダクトイオンを選択することで各ペプチドに特異的な MRM/SRM transition を組むことが可能である。**Fig. 5-2** に Q3 の例として、EGFR1172 (pY1172) および EGFR1172 (pS1166)それぞれの y ion (y6~y14)系列を示した。**Fig. 5-2** に示す通り、y8~y13 ion のプロダクトイオンであれば EGFR1172 (pY1172)および EGFR1172 (pS1166)は Q3 において質量分離をすることが可能である。しかし、それ以外の y ion の場合は Q3 の m/z も両ペプチドで同一の値になってしまうため、質量分析装置における両ペプチドの区別は不可能であることが分かる。

Table 5-2 に示した今回の最適化結果において Q3 での質量分離が可能であるのは、EGFR1172 (pY1172)およびEGFR1172 (pS1166)の y10 ion のみである。それぞれのペプチドにおけるその他の 3 種類の MRM/SRM transition に関しては Q3 での質量分離が不可能となっている。従って、これら質量分離が不可能な MRM/SRM transition は LC での分離が必要不可欠であり、LC での分離もできない場合については LC-MS/MS による定量解析は困難であると考えられる。このような場合の改善策の一つとして Q3 で質量分離可能な MRM/SRM transition を採用することが挙げられるが、最適化の時点でそのような MRM/SRM transition が感度良く検出されていない。従って、現状を考えると LC において EGFR1172 (pY1172)およびEGFR1172 (pS1166)のペプチドを分離する条件を設定することが唯一の手段であると考えられる。

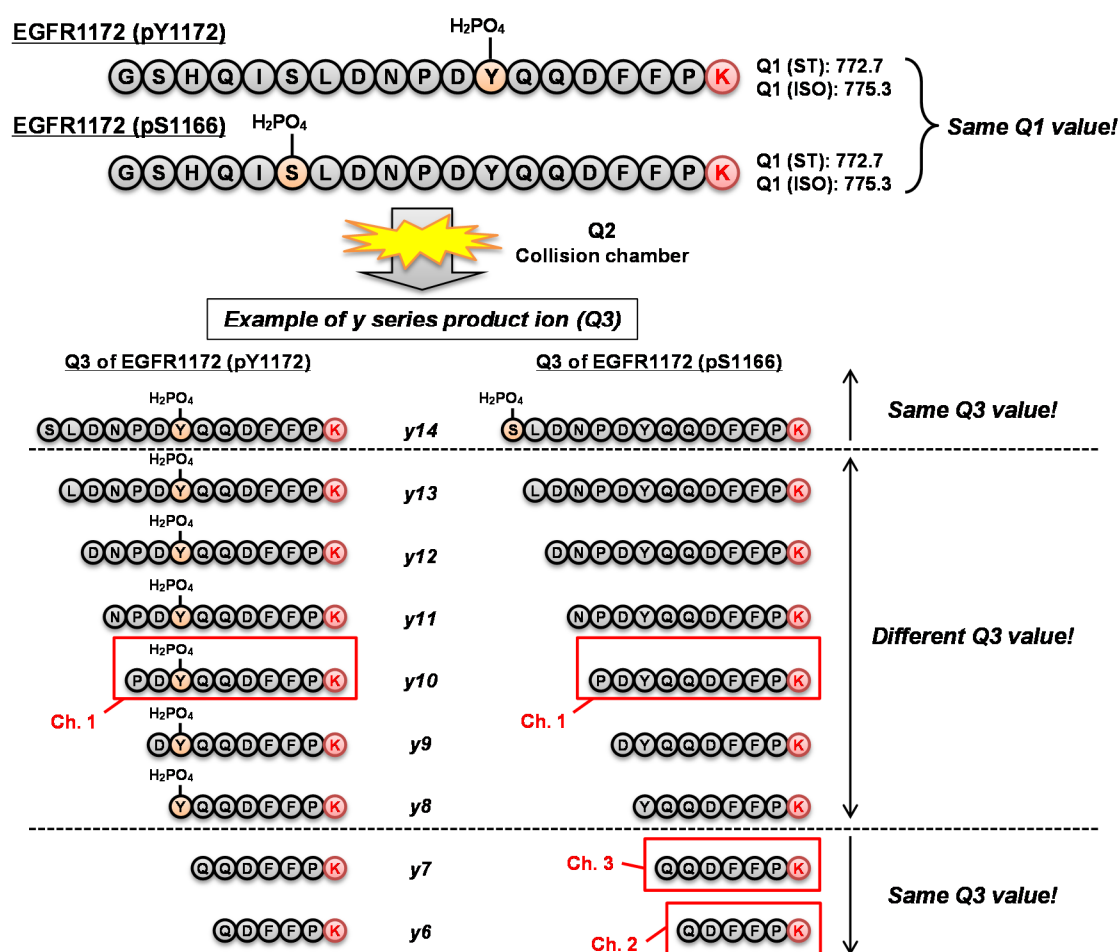
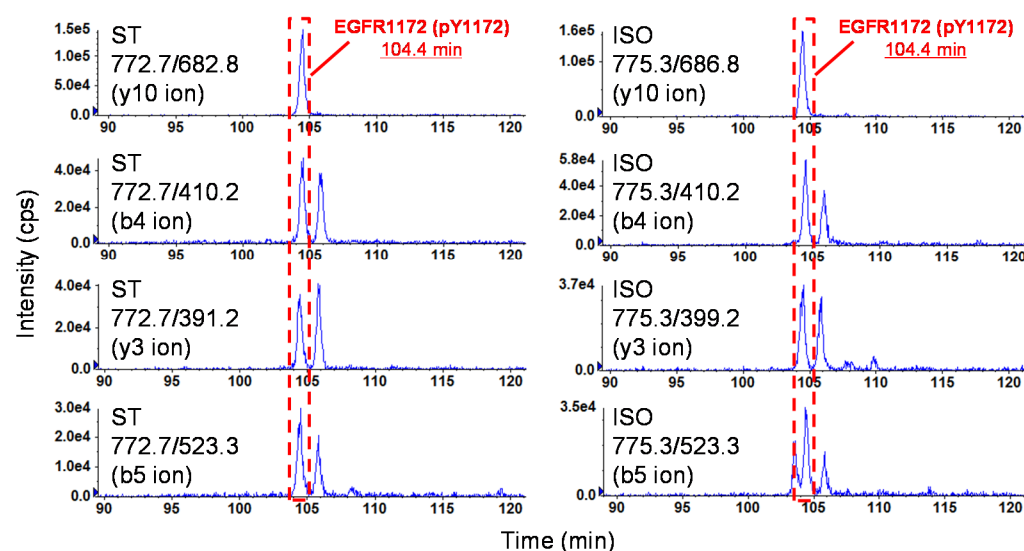


Fig. 5-2 Product ions of EGFR1172 (pY1172) and EGFR1172 (pS1166)

前述した通り、EGFR1172 (pY1172)およびEGFR1172 (pS1166)がLCを用いて分離可能であるかを検証するために、標準ペプチドを 500 fmol/injection、安定同位元素標識内標準ペプチドを 500 fmol/injection となるようにサンプルを調製しLC-MS/MS 測定を行った。LC-MS/MS 測定の結果を **Fig. 5-3** に示す。なお、Q3での質量分離が可能であるのは、EGFR1172 (pY1172)およびEGFR1172 (pS1166)の y10 ion のみである。EGFR1172 (pY1172)の y10 ion は 104.4 min 付近にピークが検出されており、その他の SRM/MRM transition においても同一保持時間にピークが検出されることから、この 104.4 min 付近のピークがEGFR1172 (pY1172)由来のピークであることが示唆された(**Fig. 5-3A**)。同様に、EGFR1172 (pS1166)

のクロマトグラムにおける保持時間 105.8 min 付近のピークは EGFR1172 (pY1166)由来のピークであることが示唆された(**Fig. 5-3B**)。

(A) EGFR1172 (pY1172): GSHQISLDNPDpYQQDFFPK



(B) EGFR1172 (pS1166): GSHQIpSLDNPDYQQDFFPK

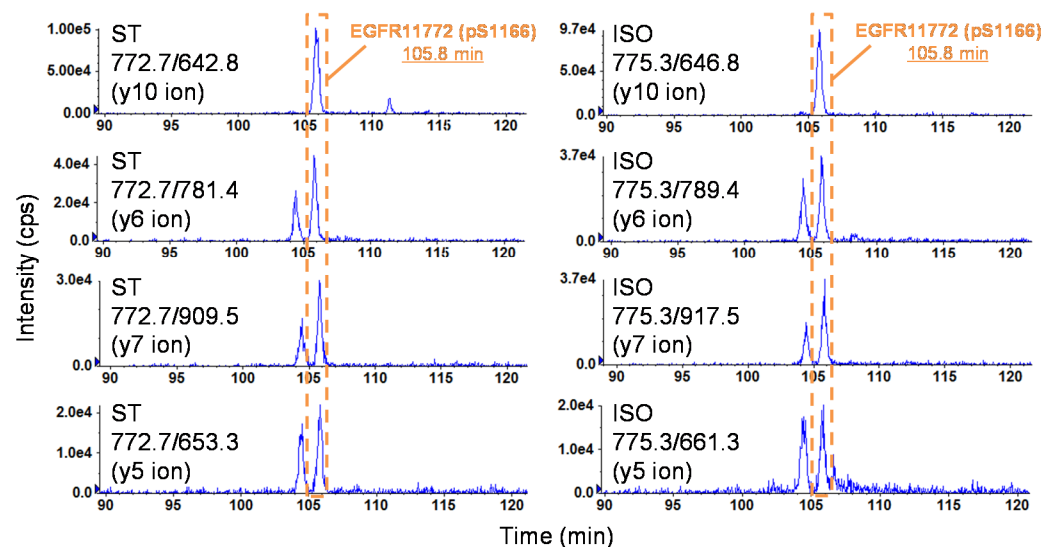


Fig. 5-3 Chromatogram of EGFR1172 (pY1172) and EGFR1172 (pS1166)

Mixture of non-labeled standard peptides (500 fmol/injection) and stable isotope-labeled peptides (500 fmol/injection), as internal standards, were analyzed by multiplexed-SRM/MRM analysis using LC-MS/MS. Chromatograms of four SRM/MRM transitions for non-labeled peptides and for stable isotope-labeled peptides were shown.

Fig. 5-3 で示した通り、EGFR1172 (pY1172)および EGFR1172 (pS1166)が LC を用いて分離できることが分かったため、6 種類のペプチドそれぞれで検量線測定を行った結果を Fig. 5-4 に示す。なお、Fig. 5-4 では設定した 4 つの MRM/SRM transition の平均値をプロットしており、全てのペプチドにおいて $R^2=0.999$ 以上と高い線形性を示した。

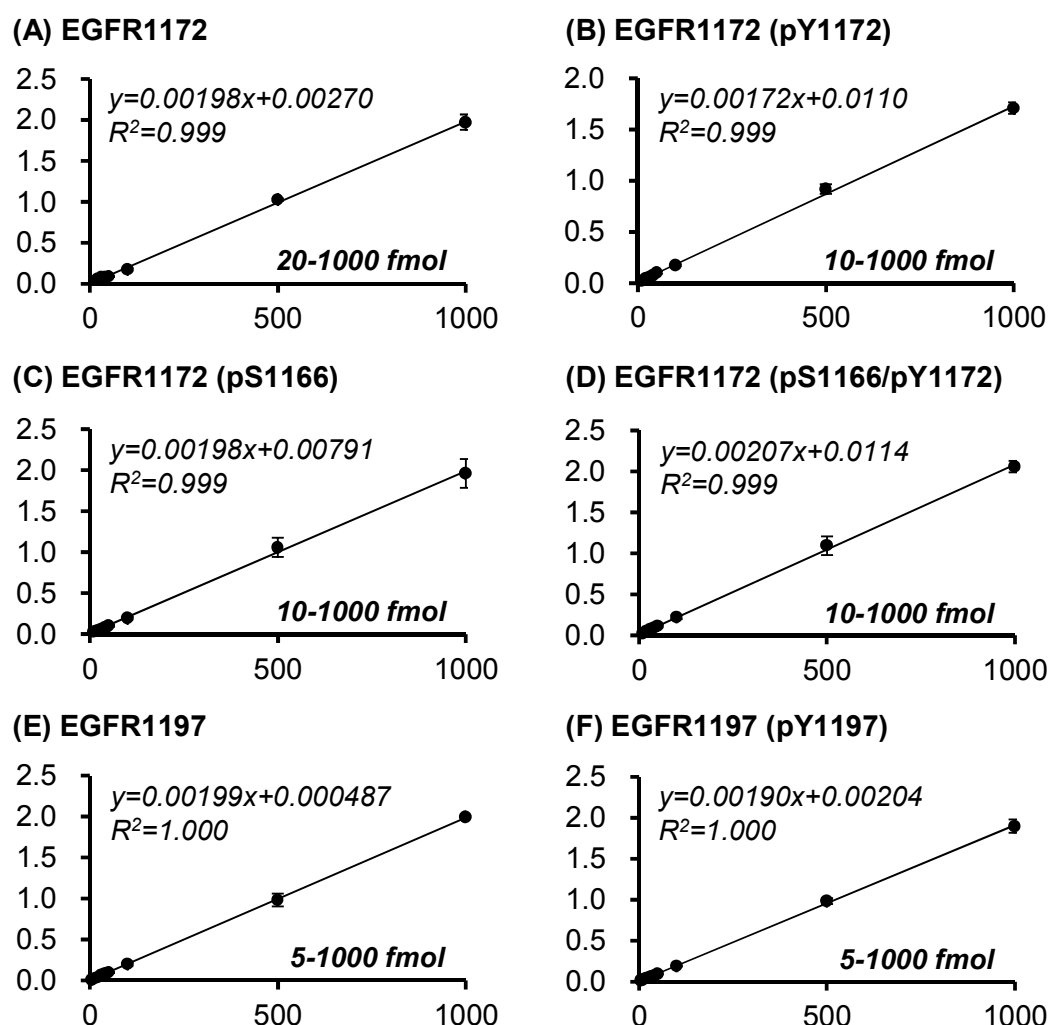


Fig. 5-4 Standard curves for absolute quantification of unphosphorylated and phosphorylated EGFR

Dilution series of the standard peptides (5, 10, 20, 30, 40, 50, 100, 500, and 1000 fmol) and 500 fmol internal standard peptides were subjected to LC-MS/MS and analyzed in SRM/MRM mode under optimized analytical conditions. The standard curves were prepared by plotting the peak area ratios of the standard and internal standard peptides (y-values) against the standard peptide amounts (x-values). Each data point represents the mean \pm S.D. ($n=1-4$ SRM/MRM transitions). R^2 : correlation coefficient.

5-2-2. EGF 処理培養細胞株を用いた EGFR 自己リン酸化体検出確認

実サンプルにおいて EGFR 自己リン酸化体の LC-MS/MS による検出が可能であるかを検証するため、ヒト上皮様細胞癌由来細胞株である A431 細胞株を用いて解析を行った。まずは、western blotting を用いて EGFR 自己リン酸化体の検出を行った。**Fig. 5-5** に示す通り、無血清培地で培養した A431 細胞株と比較して 100 ng/mL EGF (EGFR のリガンド)を 5 分間処理した A431 細胞株では、1172 番目の tyrosine がリン酸化した EGFR (EGFRpY1172)および 1197 番目の tyrosine がリン酸化した EGFR (EGFRpY1197)が高発現していることが認められた。さらに、EGFR に対する分子標的薬である erlotinib を 10 μ M の濃度で 1 時間プレインキュベーションした後に 100 ng/mL EGF (EGFR のリガンド)を 5 分間処理した A431 細胞株、および通常培養条件である 10% FBS 含有培地で培養した A431 細胞株においては、無血清培地で培養した A431 細胞株と同程度の EGFRpY1172 および EGFRpY1197 発現であった(**Fig. 5-5**)。なお、EGFR の発現に関しては上述した 4 条件の間で差は認められなかった(**Fig. 5-5**)。**Fig. 5-5** の結果からこれらのサンプルは western blotting によって EGFR 自己リン酸化体の発現が認められたため、次に実際に LC-MS/MS を用いて EGFR 自己リン酸化体の検出が可能であることを解析することとした。

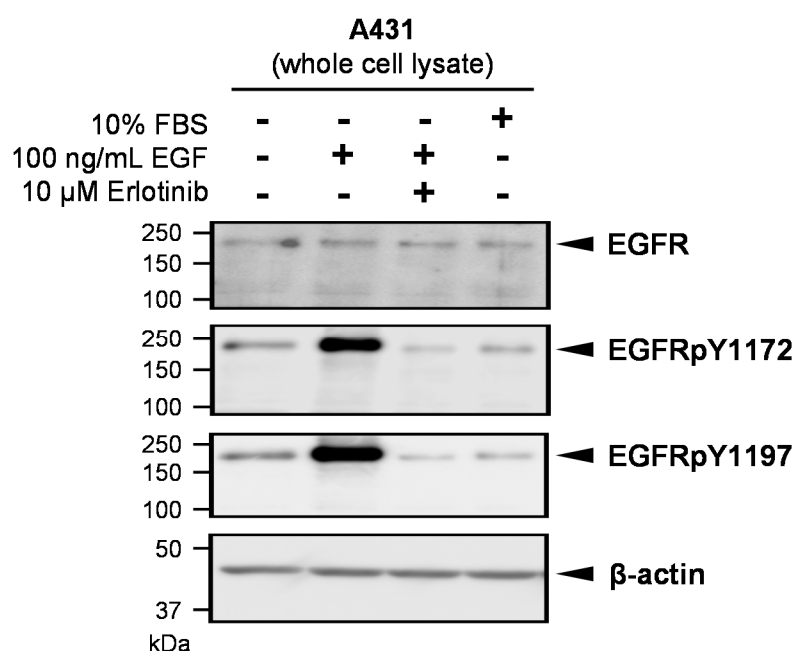


Fig. 5-5 Expression of EGFR and phosphorylated EGFR in whole cell lysate of A431 cell lines (western blot analysis)

A431 cell line was cultured under serum-starved condition for 16 hr, and stimulated with 100 ng/mL EGF for 5 min, or pre-incubated with 10 μ M erlotinib for 1 hr and then stimulated with 100 ng/mL EGF for 5 min. Whole cell lysate of these samples were subjected to SDS-PAGE. In SDS-PAGE, each sample was loaded to each lane at the same amount (5 μ g protein). Western blot analysis was performed with rabbit anti EGFR (phospho Y1172), rabbit anti EGFR (phospho Y1197), rabbit anti EGFR and mouse anti β -actin antibody. The bands of target proteins were indicated by arrows on the right side.

Fig. 5-5 で示した western blotting で使用した A431 細胞株 whole cell lysate の各サンプルを用いて LC-MS/MS による EGFR 自己リン酸化体の発現解析を行った結果を **Table 5-3** に示す。結果、EGFR 自己リン酸化を認識するペプチドである EGFR1172 (pY1172)および EGFR1197 (pY1197)の発現は EGF のみで刺激を行った A431 細胞株でのみそれぞれ認められた(**Table 5-3**)。また、非リン酸化体を認識するペプチドである EGFR1172 および EGFR1197、EGFR 全体の発現を認識するペプチドである EGFR-all に関しては全てのサンプルにおいて発現が認められた。なお、自己リン酸化部位ではないが 1166 番目の serine のみがリン酸化された EGFR1172 (pS1166)の発現は EGF 処理の前にあらかじめ erlotinib でプレインキュベーションを行ったサンプル(EGF/Erlotinib)を除いて発現が認められた。

Table 5-3 Expression of EGFR and phosphorylated EGFR in whole cell lysate of A431 cell lines (LC-MS/MS analysis)

	Quantitative value in whole cell lysate (fmol/ug protein)			
	A431 (without HAMMOC)			
	EGF(-)	EGF(+)	EGF/Erlotinib	10% FBS
EGFR1172 (Non-P)	14.0 ± 0.6	11.1 ± 0.5	15.5 ± 1.0	14.5 ± 0.5
EGFR1172 (pY1172)	U.L.Q.	3.29 ± 0.06	U.L.Q.	U.L.Q.
EGFR1172 (pS1166)	2.49 ± 0.41	1.56 ± 0.35 *	U.L.Q.	1.43 ± 0.12 *
EGFR1172 (pS1166/pY1172)	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.
EGFR1197 (Non-P)	10.7 ± 0.7	8.44 ± 0.78	9.84 ± 0.44	10.1 ± 0.7
EGFR1197 (pY1197)	U.L.Q.	1.49 ± 0.03	U.L.Q.	U.L.Q.
EGFR-all	11.1 ± 0.8	8.46 ± 0.49	10.1 ± 1.0	9.20 ± 0.16

A431 cell line was cultured under serum-starved condition for 16 hr, and stimulated with 100 ng/mL EGF for 5 min, or pre-incubated with 10 μM erlotinib for 1 hr and then stimulated with 100 ng/mL EGF for 5 min. Whole cell lysate of these samples were analyzed by multiplexed-SRM/MRM analysis using LC-MS/MS. The expression amount of each molecule was determined as the average of two to four quantitative values from four SRM/MRM transitions of one analysis. Each value represents the mean ± S.E.M. (n=2-4 SRM/MRM transitions). U.L.Q. means “under limit of quantification”. *The reliability of the calculated values was considered to be lower than other detected molecules, since only two among four SRM/MRM transitions gave the detectable peaks over 5,000 counts.

Table 5-3 に示す通り、EGFR 自己リン酸化体は EGF 処理サンプルのみで発現が認められたが、微量のリン酸化体を検出するために HAMMOC 法(Hydroxy acid-modified metal oxide chromatography)を利用してリン酸化ペプチドを精製濃縮した後に発現解析を行った。なお、HAMMOC 法は酸性条件下でリン酸基を二酸化チタンが吸着する性質を用いたリン酸化ペプチド選択的な精製濃縮法である。結果、EGF 処理サンプル以外の 3 サンプル(EGF(-), EGF/Erlotinib, 10% FBS)に関しても EGFR 自己リン酸化体の発現が認められ、EGF 処理サンプルと比較すると低発現していることが認められた(**Table 5-4**)。また、1166 番目の serine および 1172 番目の tyrosine がともにリン酸化している EGFR1172 (pS1166/pY1172) に関しても複数のサンプル(EGF(-)および EGF(+))で発現が認められた(**Table 5-4**)。なお、HAMMOC 法はリン酸化ペプチドを精製濃縮する方法であるため、非リン酸化ペプチドに関してはピークの検出は認められなかった。

Table 5-4 Expression of EGFR and phosphorylated EGFR in whole cell lysate of A431 cell lines after enrichment of phosphopeptides based on aliphatic hydroxy acid-modified metal oxide chromatography (LC-MS/MS analysis)

	Quantitative value in whole cell lysate (fmol/ug protein)			
	A431 (with HAMMOC)			
	EGF(-)	EGF(+)	EGF/Erlotinib	10% FBS
EGFR1172 (Non-P)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
EGFR1172 (pY1172)	0.759 ± 0.034	2.54 ± 0.09	0.0239 ± 0.0055	0.348 ± 0.009
EGFR1172 (pS1166)	2.16 ± 0.15	1.39 ± 0.06	1.15 ± 0.08	1.09 ± 0.08
EGFR1172 (pS1166/pY1172)	0.0814 ± 0.0388	0.330 ± 0.046	U.L.Q.	U.L.Q.
EGFR1197 (Non-P)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
EGFR1197 (pY1197)	0.391 ± 0.034	1.69 ± 0.05	0.0994 ± 0.0373	0.213 ± 0.043
EGFR-all	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

A431 cell line was cultured under serum-starved condition for 16 hr, and stimulated with 100 ng/mL EGF for 5 min, or pre-incubated with 10 μ M erlotinib for 1 hr and then stimulated with 100 ng/mL EGF for 5 min. Whole cell lysate of these samples were analyzed by multiplexed-SRM/MRM analysis using LC-MS/MS after enrichment of phosphopeptides based on aliphatic hydroxy acid-modified metal oxide chromatography. The expression amount of each molecule was determined as the average of two to four quantitative values from four SRM/MRM transitions of one analysis. Each value represents the mean \pm S.E.M. (n=2-4 SRM/MRM transitions). U.L.Q. means “under limit of quantification”. N.D.; Not detected

5-2-3. 悪性脳腫瘍 xenograft における EGFR 自己リン酸化体発現解析

米国 Mayo Clinic から提供を受けた GBM xenograft line の plasma membrane fraction を用いてリン酸化 EGFR 発現解析を行った。各検体の詳細に関しては第 4 章 89 ページの Table 4-1 に示した。各体を phosphatase inhibitor 含有バッファを使用して plasma membrane fraction 調製を行い、この plasma membrane fraction の酵素消化産物(Lys-C/Trypsin)を用いて LC-MS/MS によるリン酸化 EGFR 発現解析を行った。発現解析の結果、リン酸化 EGFR ペプチド関連では EGFR1172 (pS1166) の発現が最も多くの検体(MayoGBM22 を除く 5 検体)で認められた(Table 5-5)。また、EGFR の自己リン酸化部位である EGFR1172 (pY1172) の発現は MayoGBM39 のみで、同じく自己リン酸化部位である EGFR1197(pY1197)の発現は MayoGBM8, MayoGBM12, MayoGBM39 の 3 検体で認められた(Table 5-5)。一方で、自己リン酸化部位 pY1172 とリン酸化部位 pS1166 が同時にリン酸化している EGFR1172 (pS1166/pY1172)の発現は全ての検体で認められなかった(Table 5-5)。Table 5-5 において EGFR-all および EGFRvIII 関連の定量値は第 4 章 92 ページの Table 4-2 で示した値を引用している。なお、Table 5-5 で*を付けた定量値は各測定で設定した 4 つの SRM/MRM transition のうち 2 つの SRM/MRM transition でピークが検出されたものであり、信頼性に劣る定量値として記載している。

Table 5-5 Quantitative value of phosphorylated EGFR in GBM xenografts

	Quantitative value in plasma membrane fraction (fmol/ug protein)					
	MayoGBM6	MayoGBM8	MayoGBM10	MayoGBM12	MayoGBM22	MayoGBM39
EGFR1172 (Non-P)	23.4 ± 1.0	69.9 ± 1.9	5.20 ± 0.57	17.0 ± 0.4	5.04 ± 0.24	62.8 ± 1.5
EGFR1172 (pY1172)	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	0.843 ± 0.068 *
EGFR1172 (pS1166)	8.25 ± 0.48	32.4 ± 0.3	2.81 ± 0.33 *	8.93 ± 0.65	U.L.Q.	20.4 ± 0.8
EGFR1172 (pS1166/pY1172)	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.
EGFR1197 (Non-P)	21.7 ± 0.6	73.2 ± 1.1	5.04 ± 0.16	17.1 ± 0.3	3.77 ± 0.16	56.4 ± 1.3
EGFR1197 (pY1197)	U.L.Q.	0.575 ± 0.071	U.L.Q.	0.335 ± 0.027	U.L.Q.	0.396 ± 0.058
EGFR-all ^A	76.5 ± 0.9	245 ± 5	7.33 ± 0.49	21.0 ± 1.1	10.0 ± 1.2	161 ± 9
EGFRvIII ^{A,B}	73.7	59.3	- ^C	6.57	1.60	157

Plasma membrane fraction of GBM xenograft lines (MayoGBM6, GBM8, GBM10, GBM12, GBM22, GBM39) were analyzed by multiplexed-SRM/MRM analysis using LC-MS/MS. The expression amount of each molecule was determined as the average of two to eight quantitative values from four SRM/MRM transitions of one or two analysis. Each value represents the mean ± S.E.M. (n=2-8 SRM/MRM transitions). U.L.Q. means “under limit of quantification”. *The reliability of the calculated values was considered to be lower than other detected molecules, since only two among four SRM/MRM transitions gave the detectable peaks over 5,000 counts. ^{A)} Quantitative values from Table 4-2, ^{B)} EGFRvIII = (EGFR-WT,vII~V) – (EGFR-WT,vII,IV,V), ^{C)} Quantitative value under zero

リン酸化の発現量だけではなく発現している EGFR 全体に占めるリン酸化 EGFR の割合を求めるため、EGFR-all または EGFRvIII 発現量に対する各リン酸化体の発現量の比を算出した(**Table 5-6**)。EGFR 全体の発現量(EGFR-all)に対する EGFR1172 (pS1166)のリン酸化割合は 10.8-42.6%の範囲であり、最もリン酸化割合が高い検体(MayoGBM12)ではほぼ 4 割の EGFR がリン酸化していることが認められた。この検体では EGFRvIII 発現量に対する割合が 136%と 100%を超えたことから、EGFRvIII 発現量以上にリン酸化が亢進していることが示唆された。一方で、EGFR1197 (pY1197)のリン酸化割合に関しては **Table 5-4** に示す通り発現量が 1 fmol/ug protein 以下であったことから、リン酸化割合も 1%前後の値であった。

Table 5-6 Expression ratio of phosphorylated EGFR to EGFR-all or EGFRvIII

	Quantitative value (fmol/ug protein)		Expression ratio (%)				
	EGFR-all ^A	EGFRvIII ^{A,B}	EGFRvIII	EGFR1172 (pS1166)		EGFR1197 (pY1197)	
			vs EGFR-all	vs EGFR-all	vs EGFRvIII	vs EGFR-all	vs EGFRvIII
MayoGBM6	76.5 ± 0.9	73.7	96.3	10.8	11.2	U.L.Q.	U.L.Q.
MayoGBM8	245 ± 5	59.3	24.2	13.2	54.7	0.234	0.969
MayoGBM10	7.33 ± 0.49	- ^C	- ^C	38.4	- ^C	U.L.Q.	- ^C
MayoGBM12	21.0 ± 1.1	6.57	31.4	42.6	136	1.60	5.10
MayoGBM22	10.0 ± 1.2	1.60	16.0	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.
MayoGBM39	161 ± 9	157	97.5	12.7	13.0	0.246	0.252

Quantitative value represents the mean ± S.E.M. (n=2-4 SRM/MRM transitions). U.L.Q. means “under limit of quantification”. ^{A)} Quantitative values from Table 4-2, ^{B)} EGFRvIII = (EGFR-WT,vII~V) – (EGFR-WT,vII,IV,V), ^{C)} Each value was not calculated because quantitative value of EGFRvIII was under zero.

次に、**Fig. 5-6** に示す通り、EGFR の各リン酸化体の発現量が EGFR チロシンキナーゼ阻害薬(EGFR-TKI)である erlotinib に対する感受性に関与しているかどうかを調べるため比較解析を行った。Erlotinib は EGFR リン酸化を阻害するため、作用機序から考えると EGFR のリン酸化が認められる検体ほど erlotinib 感受性であると考えられる。しかし、**Fig. 5-6D, E, G** に示す通り、各リン酸化体発現量と erlotinib 感受性との間に明確な相関は得られなかった。ただし、唯一 EGFR1172 (pY1172)の発現が認められた MayoGBM39 に関しては erlotinib 感受性であるという結果となっている(**Fig. 5-6D**)。

EGFR の各リン酸化体発現量ではなくリン酸化割合と erlotinib 感受性との関係性を調べるため、EGFR 各リン酸化体発現量の EGFR-all または EGFRvIII 発現量に対する割合と erlotinib 感受性との比較解析を行った(**Fig. 5-7**)。 **Fig. 5-7D** に示す通り、EGFR-all 発現量に対する EGFR1197 (pY1197)の発現割合が高い検体において erlotinib 感受性となる傾向が認められた。

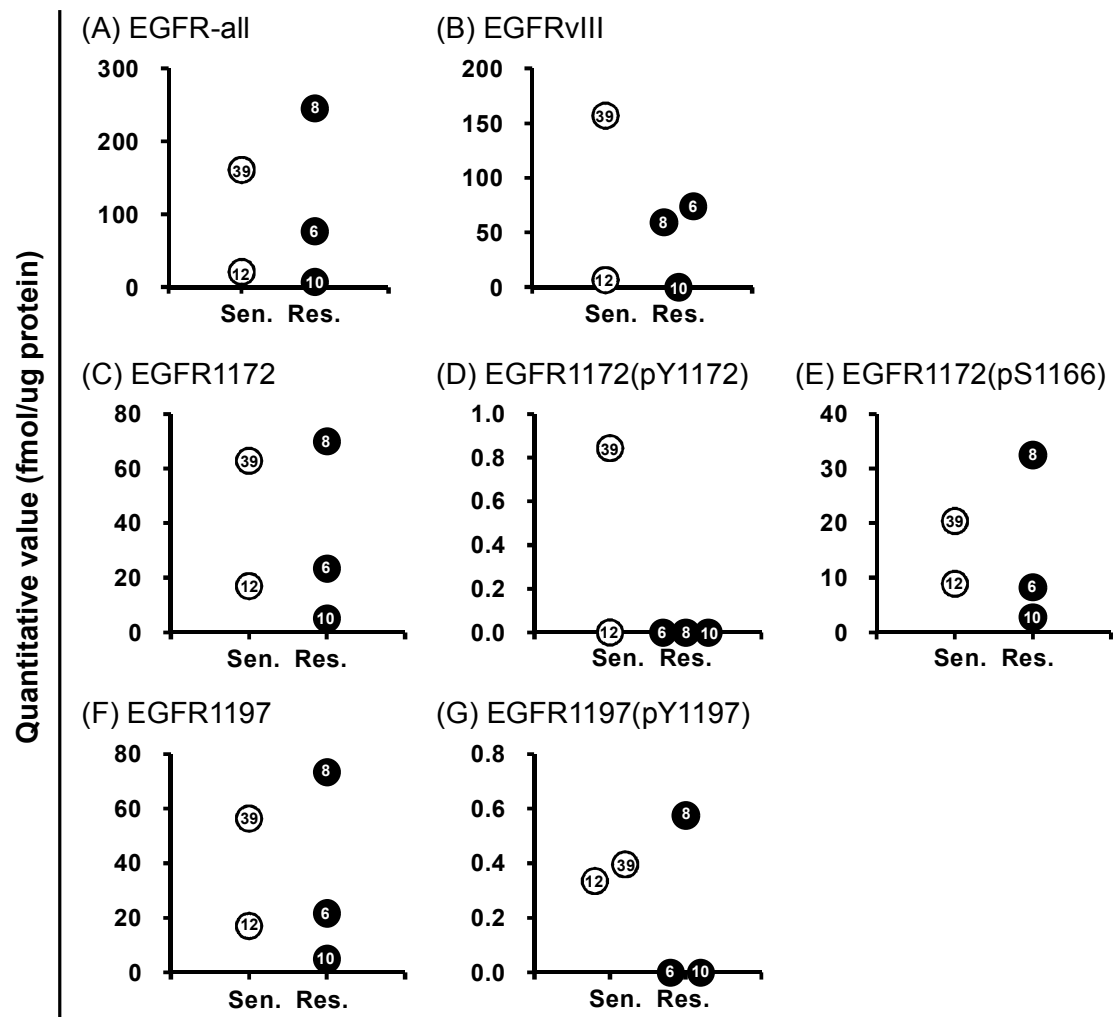


Fig. 5-6 Correlation between expression of phospholyrated EGFR and erlotinib sensitivity

Plasma membrane fraction of GBM xenograft lines (MayoGBM6, GBM8, GBM10, GBM12, GBM22, GBM39) were analyzed by multiplexed-SRM/MRM analysis using LC-MS/MS. The expression amount of each molecule was determined as the average of two to four quantitative values from four SRM/MRM transitions of one analysis. Sen.: Sensitive, Res.: Resistant.

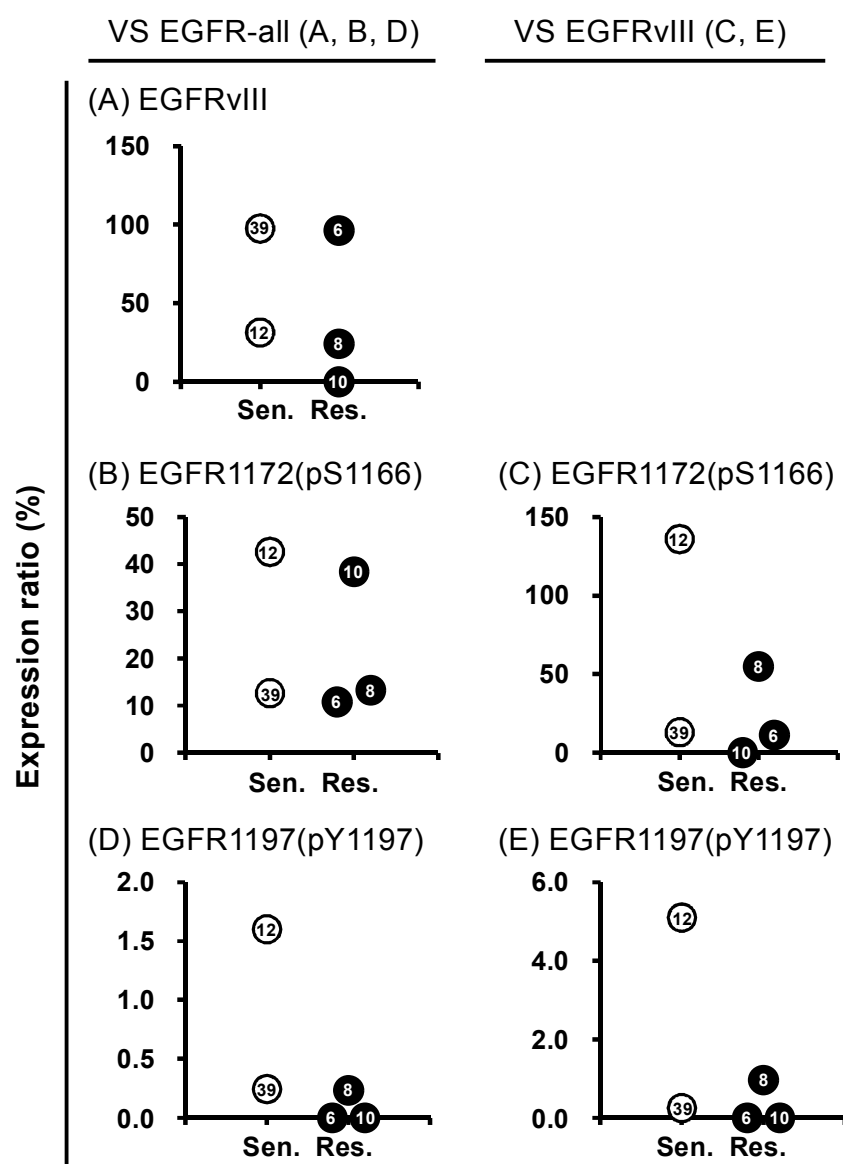


Fig. 5-7 Correlation between expression ratio of phosphorylated EGFR to EGFR-all or EGFRvIII and erlotinib sensitivity

Plasma membrane fraction of GBM xenograft lines (MayoGBM6, GBM8, GBM10, GBM12, GBM22, GBM39) were analyzed by multiplexed-SRM/MRM analysis using LC-MS/MS. The expression amount of each molecule was determined as the average of two to four quantitative values from four SRM/MRM transitions of one analysis. Sen.: Sensitive, Res.: Resistant.

第3節 考察

本研究では、EGFR の自己リン酸化体(EGFRpY1172 および EGFRpY1197)を直接絶対定量する手法を確立し、定量法の評価として培養細胞株を、実際の腫瘍組織として GBM xenograft line を用いて発現解析を行った。

EGF で処理をした A431 細胞株および処理を行っていない A431 細胞株の whole cell lysate について EGFR 自己リン酸化体の発現解析を行ったところ、それぞれの自己リン酸化部位を認識する EGFR1172 (pY1172)および EGFR1197 (pY1197)の定量値は増加したため、EGF 処理によってこれらリン酸化量が増加したことが示唆された(**Table 5-3, 5-4**)。一方で、EGFR1172 (pS1166)に関しては EGF 処理を行うことで発現量が低下した。これまでの報告で、EGF を培養細胞株に処理すると自己リン酸化部位等はこれまでに報告されている通りリン酸化レベルが上昇するが、1166 番目の serine のリン酸化は減少することがプロテオミクス解析によって認められている(Imami *et al.*, 2012)。同じリン酸化部位でもこの Ser1166 はネガティブフィードバックとして働いているとも考えられており、今回 EGF 処理によって EGFR1172 (pS1166)のリン酸化発現量が偶然減少してしまったのではなく、実際にネガティブフィードバックに関与している部分である可能性が考えられる。また、EGF 処理前にあらかじめ EGFR の tyrosine kinase inhibitor (EGFR-TKI)である erlotinib を処理した場合、EGF 単独処理時と比較して EGFR1172 (pY1172)および EGFR1197 (pY1197)の発現量が低下した(**Table 5-3, 5-4**)。今回定量対象とした 2 つの自己リン酸化部位(EGFRpY1172 および EGFRpY1197)は EGFR のリン酸化部位の中でも重要であることが報告されており(Zhang *et al.*, 2011)、研究も最も良く行われている部位である。これらの EGFR 自己リン酸化部位に関しては、EGF 刺激を行うとリン酸化が上昇してその後タイムラグがあって下流のシグナルがリン酸化していくという報告がされている(Olsen *et al.*, 2006, Morandell *et al.*, 2008)。また、EGF 処理を行った細胞株に

erlotinib を処理することで EGFRpY1172 リン酸化が抑制されることも報告されている(Ioannou *et al.*, 2011)。さらに、**Fig. 5-5** に示す通り western blotting を用いて解析した結果からも EGF 処理を行うことで EGFRpY1172 および EGFRpY1197 の自己リン酸化体発現量が増加し、これは erlotinib をあらかじめ処理することで抑制されるという結果となっており、LC-MS/MS を用いた EGFR 自己リン酸化体発現解析の結果と同様の傾向を示した。従って、これら 2 つのリン酸化部位のリン酸化量の変動が過去の報告および western blotting の結果と一致したものとなっており、本定量法がリン酸化の定量に有用であることが示唆された。また、**Table 5-4** に示す通り、HAMMOC 法を用いたリン酸化ペプチド精製濃縮法を用いることでより微量のリン酸化体の検出が可能であることも示唆された。

次に、**Fig. 5-6** に示す通り、EGFR の各リン酸化体の発現量が EGFR -TKI である erlotinib に対する感受性に関与しているかを解析した。第 4 章で述べた通り、EGFR および EGFRvIII の発現量のみでは erlotinib 感受性を説明できない検体が一部存在することがすでに認められている。特に、MayoGBM6 に関しては EGFR-all および EGFRvIII 高発現かつ EGFRvIII 発現割合が高いにも関わらず erlotinib 耐性となっている。Erlotinib は EGFR リン酸化を阻害する分子標的薬ため、作用機序から考えると EGFR のリン酸化が認められる検体ほど erlotinib に対して感受性になると考えられる。実際に、EGFR が発現している非小細胞肺癌細胞株に対し EGFR に対する siRNA を処理したところ、唯一 EGFR のリン酸化が検出された EGFR 発現細胞株のみコントロールと比較して細胞増殖の抑制が認められたことが報告されている(Shien *et al.*, 2012)。しかし、**Fig. 5-6D, E, G** に示す通り、各リン酸化体発現量と erlotinib 感受性との間に明確な相関性は認められなかった。

次に、EGFR 発現量から erlotinib 感受性を完全には説明できなかった MayoGBM6 に関して、各リン酸化体の EGFR 発現量に対する割合の観点から考

察する。**Fig. 5-7D** に示す通り、EGFR の自己リン酸化部位である EGFR1197 (pY1197)の EGFR 全体の発現量に対する発現割合が高い検体において erlotinib 感受性となる傾向が認められた。MayoGBM6 は EGFR-all および EGFRvIII 高発現かつ EGFRvIII 発現割合が高いという EGFR 発現特性から EGFR のリン酸化発現割合が高いことが予想されたが **Table 5-6** および **Fig. 5-7** に示す通りリン酸化割合は低いことが認められた。従って、MayoGBM6 が erlotinib 耐性である理由は EGFR のリン酸化が EGFR および EGFRvIII 発現量から予想された程亢進しておらず、erlotinib の EGFR リン酸化阻害効果が認められなかったためであると考えられる。

以上、第 5 章の結論として、EGFR の自己リン酸化体(EGFRpY1172 および EGFRpY1197)を直接絶対定量する手法を確立し、*in vivo* 組織である GBM xenograft line においても EGFR 自己リン酸化体の発現を検出することが可能であることが示された。また、EGFR および EGFRvIII 発現量のみでは一部説明ができなかった erlotinib 感受性に関しても、EGFR 全体の発現に対する EGFR 自己リン酸化体発現割合からのアプローチを加味することで説明が可能となることが示唆された。

第 6 章 安定同位元素標識タンパク質を用いた分子標的薬感受性関連分子一斉定量法の確立および発現解析

第 1 節 序論

第 1 章でも述べた通り、増殖因子受容体を起点とする腫瘍増殖シグナル伝達には増殖因子受容体に加え、受容体のリガンド、細胞内のシグナル関連分子が関与している。従って、分子標的薬感受性変動の要因を明らかにするうえで、また、分子標的療法のターゲット候補分子の拡大を行ううえで、これら分子の発現を考慮に入れることも非常に重要であると考えられる。増殖因子受容体を起点とするシグナル伝達に関与する主な分子を **Fig. 6-1** に示す。なお、**Fig. 6-1** には第 3 章および第 4 章で発現解析対象としていた増殖因子受容体も含まれている。このように多数の分子が存在するため、本研究ではこれら分子標的薬の感受性に関与すると考えられる分子の定量用ペプチドを数珠つなぎにした安定同位元素標識内標準タンパク質を人工的に作製し、多数の分子の一斉定量を可能にする手法を確立することにした(詳細なデザインは **Fig. 6-2**)。

安定同位元素標識タンパク質の合成方法として、本研究では無細胞タンパク質合成系を用いた。無細胞タンパク質合成系とは、タンパク質合成に必要な細胞成分の抽出液にアミノ酸、ATP などのエネルギー源、目的タンパク質をコードする RNA や DNA を加え、これらを鋳型としてタンパク質を試験管内で合成する方法である(Utsumi, 2010)。無細胞タンパク質合成系では、必要な成分を混合することによりタンパク質合成を行うため、迅速で簡便な合成が可能である。また、安定同位元素標識アミノ酸を反応系に添加することでタンパク質の標識が容易になるため、本研究の定量法確立に適していると考えられる。

従って、本章では、まず安定同位元素標識タンパク質を合成することで **Fig. 6-1** に記載した分子を含む分子標的薬感受性関連分子一斉定量法の確立を行うこと

を目的とした。さらに、この定量法を GBM xenograft line に応用することでこれから分子標的薬感受性関連分子の発現プロファイルを明らかにし、GBM xenograft line における薬剤感受性の変動に関与し得る候補因子を明らかにすることを目的とした。

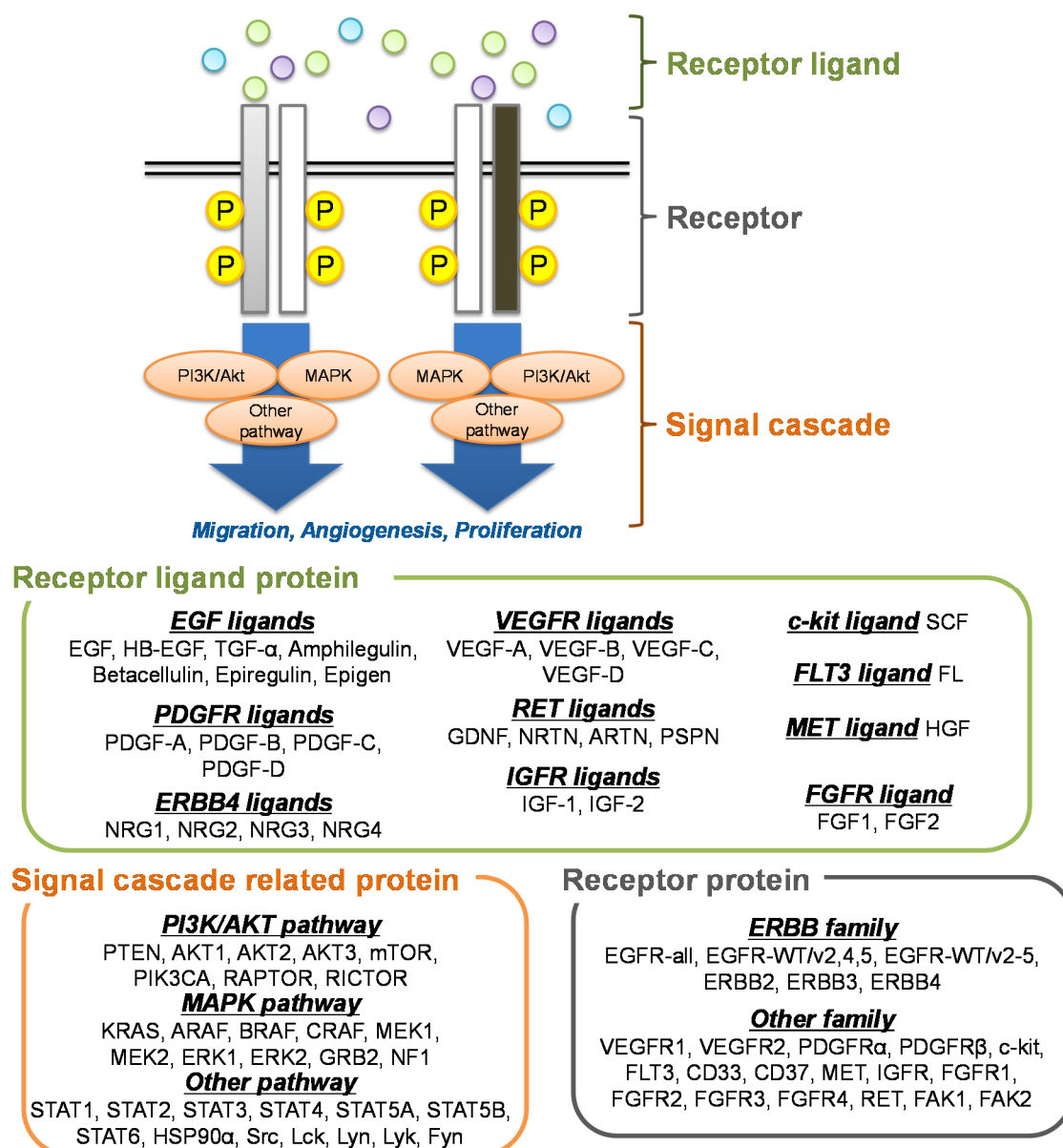


Fig. 6-1 List of protein for quantification by using stable isotope-labeled proteins

第2節 結果

6-2-1. 分子標的薬感受性関連分子一斉定量用タンパク質の合成

本章 第1節で述べた通り、本研究では分子標的薬の感受性に関与すると考えられる分子の定量用ペプチドを数珠つなぎにした安定同位元素標識内標準タンパク質を人工的に作製した。人工的に合成するタンパク質の構造を **Fig. 6-2** に示す。合成タンパク質をアフィニティ精製するために、N 末端側および C 末端側に精製用のアミノ酸配列を配置した (**Fig. 6-2** の Tag-N-terminal および Tag-C-terminal の部分)。さらに、自然界には存在しないモニタリングペプチドとして N 末端側および C 末端側にそれぞれ異なるアミノ酸配列を組み込んだ配列を合成することで合成量の測定を可能にした (**Fig. 6-2** の Tag-N-terminal および Tag-C-terminal の部分)。

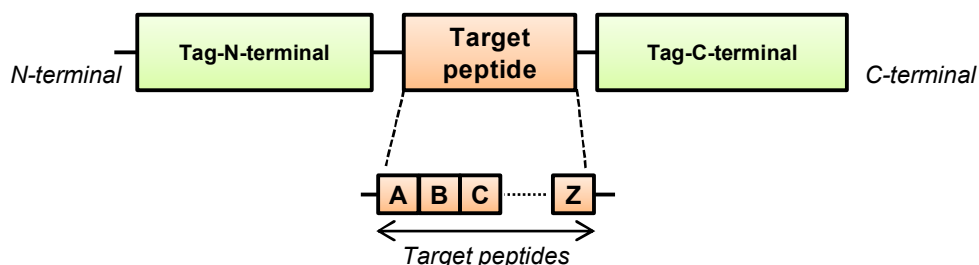


Fig. 6-2 Design of recombinant protein for quantification of multiple protein

本章 第1節で述べた定量対象分子に関して、第8章 実験方法に示すペプチド選択クライテリア(153 ページ)に基づいて各分子に特異的なペプチドを設計し、各分子 1~2 種類のペプチドを定量対象として選択した(2 種類設定したペプチドに関してはそれぞれ分子名の後に-pep1 または-pep2 と表記した) (**Table 6-1**)。測定対象分子の種類ごとに 5 グループに分類し(Human Ligand Set, Mouse Ligand Set, Receptor Set, Signal Set #1, Signal Set #2)、**Table 6-1** ではそれぞれのグループ

において N 末端側から C 末端側の順にペプチドを記載した。なお、ペプチド選択クライテリアを満たすペプチドが存在しない分子については、methionine または cysteine を含みかつ特異的な配列となるペプチドが存在した場合はそのペプチドを定量対象ペプチドとして設計した。また、ヒト分子特異的に認識可能なペプチドが選択できる場合はヒト特異的ペプチドを優先的に選択した。

Table 6-1 List of peptides in the five stable isotope-labeled proteins for quantification of multiple proteins

Peptide name	Species	Peptide name	Species	Peptide name	Species	Peptide name	Species
<i>Human Ligand Set (N>>> C-terminal)</i>		<i>Mouse Ligand Set (N>>> C-terminal)</i>		<i>Receptor Set (N>>> C-terminal)</i>		<i>Signal Set #1 (N>>> C-terminal)</i>	
EGF	Hu	Heparin-binding EGF	Mo	EGFR-all	Hu	PTEN	Hu / Mo
Heparin-binding EGF	Hu	Amphiregulin (AR)	Mo	EGFR-WT, vII,IV,V	Hu	AKT1-pep1	Hu
Amphiregulin (AR)	Hu	Betacellulin (BTC)	Mo	EGFR-WT, vII-V	Hu	AKT1-pep2	Hu / Mo
Epiregulin (EPR)	Hu	Epiregulin (EPR)	Mo	ERBB2-pep1	Hu	AKT2-pep1	Hu
Epigen	Hu	Epigen	Mo	ERBB2-pep2	Hu	AKT2-pep2	Hu
PDGF-A	Hu	PDGF-C-pep1	Mo	ERBB3-pep1	Hu	AKT3-pep1	Hu / Mo
TGF-α	Hu	PDGF-C-pep2	Mo	ERBB3-pep2	Hu	PIK3CA-pep1	Hu
PDGF-B	Hu / Mo	PDGF-D-pep1	Mo	ERBB4-pep1	Hu	mTOR-pep1	Hu
PDGF-C-pep1	Hu	PDGF-D-pep2	Mo	ERBB4-pep2	Hu	PIK3CA-pep2	Hu / Mo
PDGF-C-pep2	Hu	VEGF-B	Mo	VEGFR1-pep1	Hu	mTOR-pep2	Hu
PDGF-D-pep1	Hu	VEGF-C	Mo	VEGFR1-pep2	Hu	RAPTOR-pep1	Hu
PDGF-D-pep2	Hu	VEGF-D-pep1	Mo	VEGFR2-pep1	Hu	AKT3-pep2	Hu / Mo
VEGF-A-pep1	Hu	VEGF-D-pep2	Mo	VEGFR2-pep2	Hu	RAPTOR-pep2	Hu
VEGF-A-pep2	Hu	NRTN-pep1	Mo	PDGFRα-pep1	Hu	RICTOR-pep1	Hu
VEGF-B	Hu	SCF-pep1	Mo	PDGFRα-pep2	Hu	RICTOR-pep2	Hu
VEGF-C	Hu	SCF-pep2	Mo	PDGFRβ-pep1	Hu	ARAF-pep2	Hu
VEGF-D-pep1	Hu	FL-pep1	Mo	PDGFRβ-pep2	Hu	KRAS	Hu / Mo
VEGF-D-pep2	Hu	FL-pep2	Mo	c-kit-pep1	Hu	NF1-pep1	Hu / Mo
FL-pep1	Hu	HGF-pep1	Mo	c-kit-pep2	Hu	NF1-pep2	Hu / Mo
FL-pep2	Hu	TGF-α	Mo	FLT3-pep1	Hu	ARAF-pep1	Hu
HGF-pep1	Hu	HGF-pep2	Mo	CD33-pep1	Hu	BRAF-pep1	Hu / Mo
HGF-pep2	Hu	GDNF	Mo	CD33-pep2	Hu	BRAF-pep2	Hu / Mo
IGF-1	Hu / Mo	NRTN-pep2	Mo	CD37-pep1	Hu	CRAF-pep1	Hu
IGF-2-pep1	Hu / Mo	ARTN-pep1	Mo	CD37-pep2	Hu	CRAF-pep2	Hu
IGF-2-pep2	Hu / Mo	ARTN-pep2	Mo	MET-pep1	Hu	MEK1-pep1	Hu / Mo
NRTN-pep1	Hu	PSPN-pep1	Mo	MET-pep2	Hu	MEK1-pep2	Hu / Mo
NRTN-pep2	Hu	PSPN-pep2	Mo	IGFR-pep1	Hu	MEK2-pep1	Hu
ARTN	Hu			IGFR-pep2	Hu / Mo	MEK2-pep2	Hu
PSPN-pep1	Hu			FGFR1	Hu / Mo	ERK1	Hu / Mo
PSPN-pep2	Hu			FGFR2-pep1	Hu / Mo	ERK2	Hu / Mo
NRG1	Hu			FGFR2-pep2	Hu / Mo	GRB2-pep1	Hu / Mo
NRG2	Hu / Mo			FGFR3-pep1	Hu	GRB2-pep2	Hu / Mo
NRG3	Hu / Mo			FGFR3-pep2	Hu / Mo		
NRG4	Hu			FGFR4-pep1	Hu	<i>Signal Set #2 (N>>> C-terminal)</i>	
FGF1-pep1	Hu / Mo			FGFR4-pep2	Hu	STAT1-pep1	Hu
SCF	Hu			RET-pep1	Hu	STAT1-pep2	Hu
FGF1-pep2	Hu / Mo			RET-pep2	Hu	STAT2-pep1	Hu
FGF2	Hu / Mo			FAK1-pep1	Hu	STAT2-pep2	Hu
				FAK1-pep2	Hu	STAT3-pep1	Hu / Mo
				FAK2-pep1	Hu	STAT3-pep2	Hu / Mo
				FAK2-pep2	Hu	STAT4-pep1	Hu
				VEGFR1-pep1	Mo	STAT5B	Hu
				VEGFR1-pep2	Mo	STAT5A-pep2	Hu / Mo
				VEGFR2-pep1	Mo	STAT6-pep1	Hu
				VEGFR2-pep2	Mo	STAT6-pep2	Hu
				PDGFRα-pep1	Mo	HSP90α-pep1	Hu / Mo
				PDGFRα-pep2	Mo	HSP90α-pep2	Hu / Mo
				FLT3-pep2	Hu	SRC-pep1	Hu / Mo
				PDGFRβ-pep1	Mo	SRC-pep2	Hu / Mo
				PDGFRβ-pep2	Mo	LCK-pep1	Hu / Mo
						LCK-pep2	Hu / Mo
						LYN-pep1	Hu
						LYN-pep2	Hu / Mo
						STAT5A-pep1	Hu / Mo
						FYN-pep2	Hu / Mo
						LYK-pep1	Hu
						LYK-pep2	Hu
						FYN-pep1	Hu / Mo
						STAT4-pep2	Hu

Fig. 6-2 に示した人工合成タンパク質を発現させるために、**Fig. 6-3** に示すアフィニティ精製用タグおよびモニタリングペプチドが既に組み込まれている pET-17b vector を使用した。**Table 6-1** に示す数珠つなぎにした定量用ペプチドをコードする cDNA を上記 pET-17b vector に組み込むことによって、**Fig. 6-3** 下段に示す plasmid vector を構築することとした。

定量用ペプチドをコードする cDNA および pET-17b vector に対して BamHI および EcoRI を用いた制限酵素処理を行いアガロースゲル電気泳動によって解析を行った(**Fig. 6-4A**)。この DNA 断片を抽出し、ライゲーション後にコンピテントセルとしての大腸菌(DH5 α)を用いて形質転換を行った。形成したコロニーに関してコロニーPCRを行い目的の DNA が挿入されている clone を選択して DNA を抽出し、再度制限酵素処理を行った目的の DNA 断片が挿入されていることを確認し、目的の plasmid DNA が構築できていることが示唆された(**Fig. 6-4B**)。

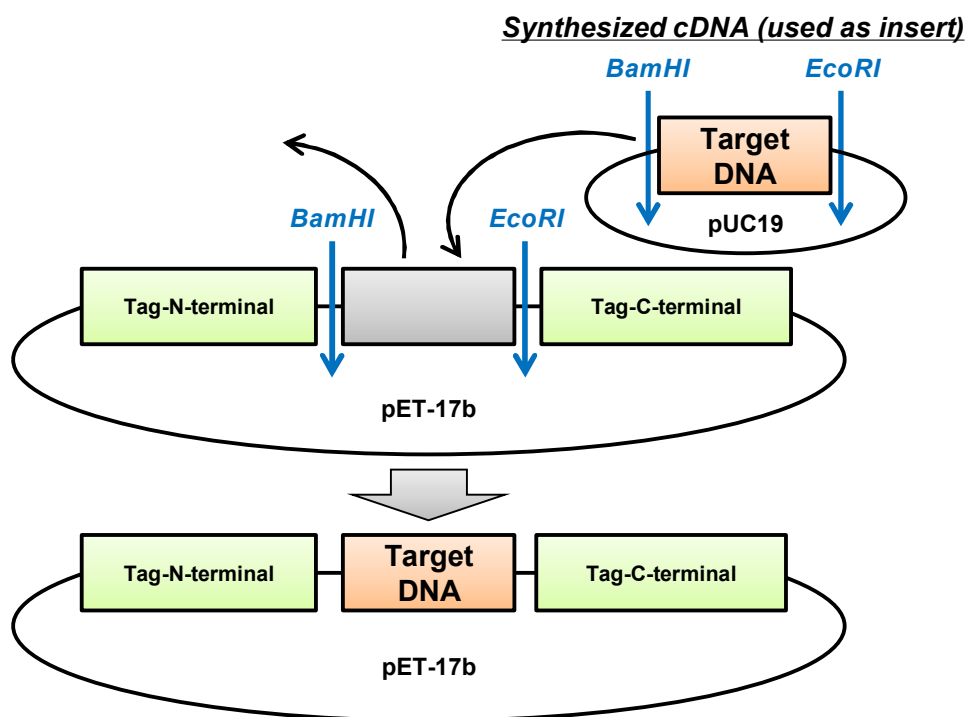


Fig. 6-3 Constraction of plasmid vector for synthesis of recombinant protein

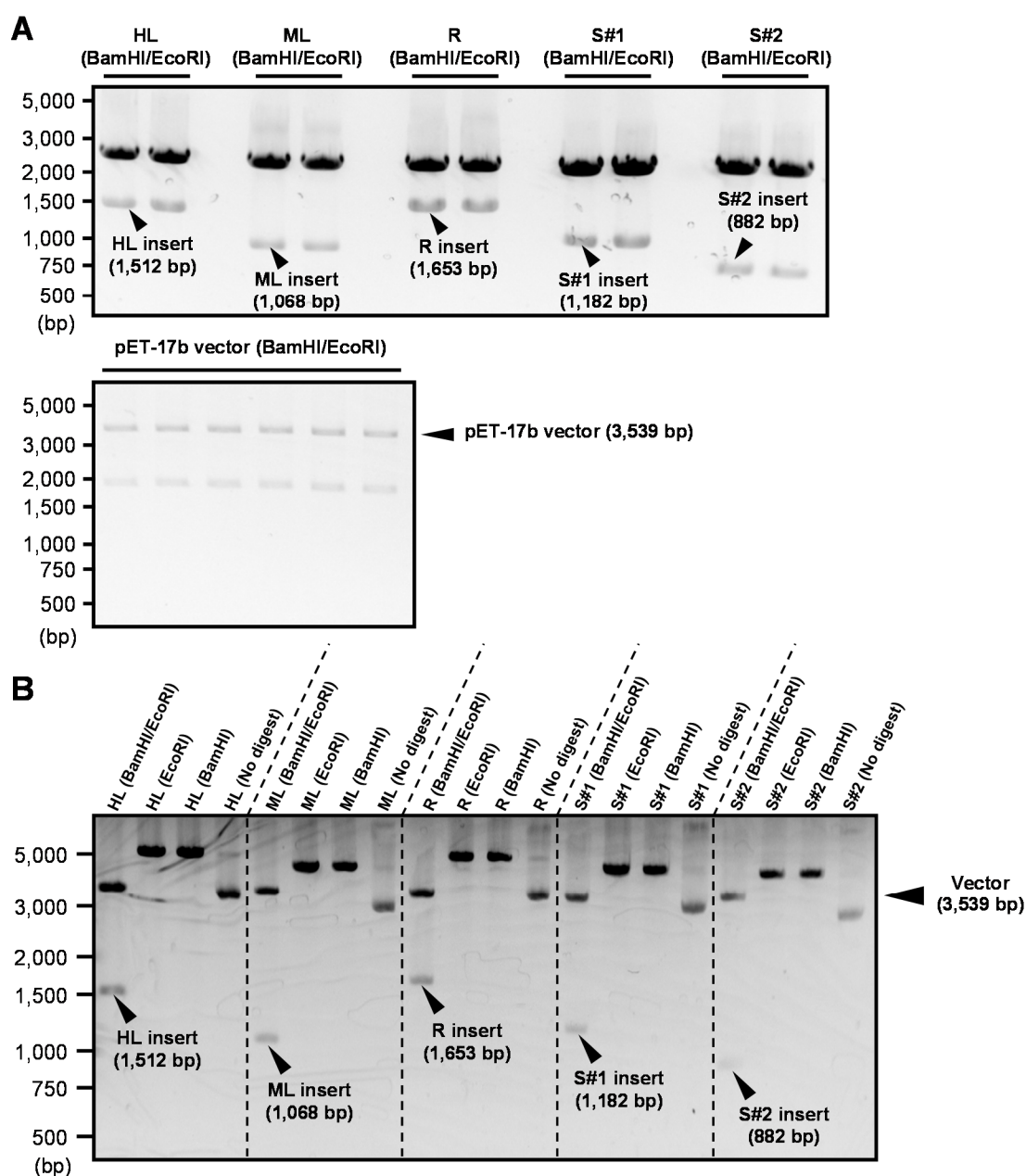


Fig. 6-4 Restriction enzyme fragmentation of cDNA

(A) The pUC19 vectors including target DNA for quantification of multiple protein and the pET-17b vector including strep-tag, HAT-tag, and reference peptides were digested with restriction enzymes, BamHI and EcoRI. Digestion products were electrophoresed on 1% agarose gel, and stained with ethidium bromide. (B) Target DNA was ligated into pET-17b vector, including Tag-N-terminal and Tag-C-terminal. The ligation product was transformed into *E. coli* DH5 α , and plasmid DNA was extracted. These ligation products including target DNA for quantification of multiple protein, Tag-N-terminal, and Tag-C-terminal were digested with restriction enzymes, BamHI and EcoRI. Digestion products were electrophoresed on 1% agarose gel, and stained with ethidium bromide. HL: Human ligand set, ML: Mouse ligand set, R: Receptor set, S#1: Signal set #1, S#2: Signal set #2.

構築した人工合成タンパク質発現用 plasmid DNA を用いて、無細胞系タンパク質合成キットである無細胞くん SI を用いた安定同位元素標識内標準タンパク質の合成を行った。合成反応終了後の溶液を total fraction、total fraction を遠心分離した後の上清を soluble fraction、沈殿(ペレット)を insoluble fraction とし、それぞれの画分に関して SDS-PAGE および CBB 染色を行った結果、5 種類全てのタンパク質(Human Ligand Set, Mouse Ligand Set, Receptor Set, Signal Set #1, Signal Set #2)のバンドは主に insoluble fraction で検出された(**Fig. 6-5**)。

合成を行った安定同位元素標識内標準タンパク質 5 種類は主に insoluble fraction で認められたため、insoluble fraction に関して引き続き N 末端側に配置したアフィニティ精製用タグ(**Fig. 6-2**)を利用したアフィニティ精製を行った。精製カラムを素通りした画分を flow-through fraction、カラム洗浄液通過後の画分を wash fraction 1-3、タンパク質溶出液通過後の画分を elute fraction 1-6 とした。これら画分に対し SDS-PAGE および CBB 染色を行ってタンパク質の精製を確認したところ、主に elute fraction 2-4 に各目的タンパク質のバンドが検出された(**Fig. 6-5**)。

以上の結果から、elute fraction 2-4 に加え、目的分子量サイズにバンドが認められた elute fraction を使用して、引き続き C 末端側に配置したアフィニティ精製用タグ(**Fig. 6-2**)を利用したアフィニティ精製を行った。N 末端側精製後の elute fraction をまとめたものを load protein sample、精製カラムを素通りした画分を flow-through fraction、カラム洗浄液通過後の画分を wash fraction 1-3、タンパク質溶出液通過後の画分を elute fraction 1-5 とした。これら画分に対し SDS-PAGE および CBB 染色を行ってタンパク質の精製を確認したところ、elute fraction 1 において目的タンパク質のバンドが最も強く検出され、Receptor Set 以外は elute fraction 1-5 の全てで目的タンパク質のバンドが検出された(**Fig. 6-6**)。また、Receptor Set に関しては elute fraction 1-2 でバンドが検出され、他の 4 種類のタン

パク質と比較すると合成量が低いことが示唆された。

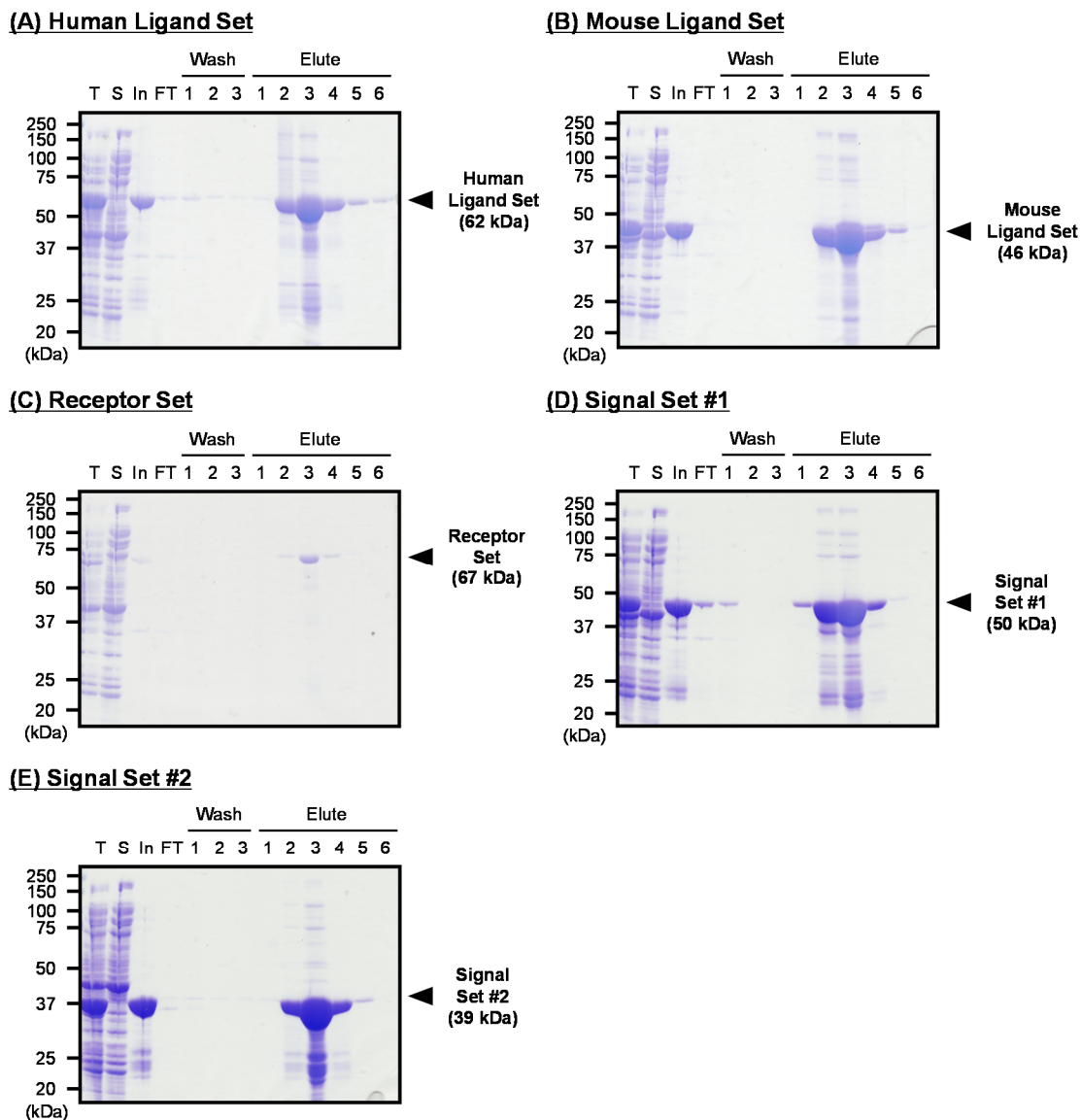
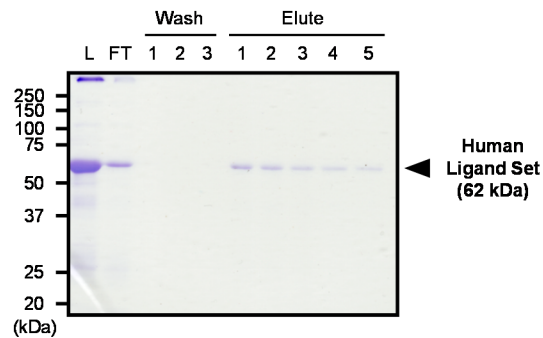


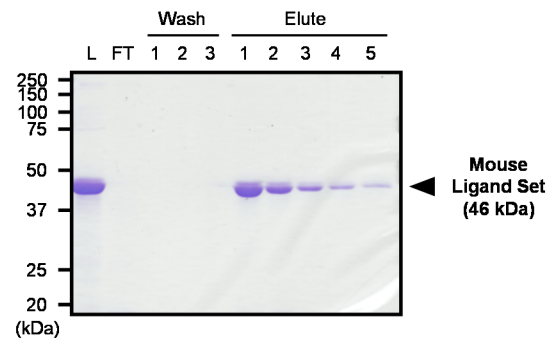
Fig. 6-5 Stable isotope-labeled protein expressions in cell-free synthesis system and purification of proteins with N-terminal strep tag

Cell-free protein synthesis kit “Musaiboukun SI” (Taiyo Nippon Sanso, Japan) and recombinant DNA were incubated for 16 hr at 30°C. Reaction solution was centrifuged, and then proteins in insoluble fraction as a pellet were purified by passing through Strep-Tactin® Sepharose® Column (IBA, Germany). Purified stable isotope-labeled proteins were electrophoresed on 10% SDS-polyacrylamide gel and stained with Coomassie Brilliant Blue R-250. T: Total fraction, S: Soluble fraction, In: Insoluble fraction, FT: Flow-through fraction.

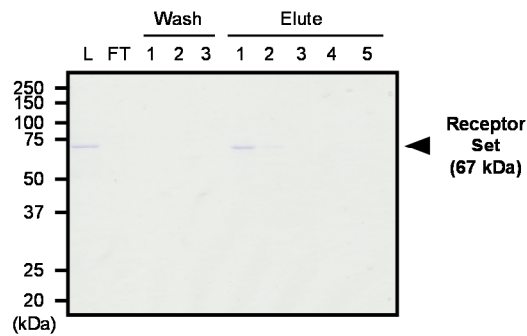
(A) Human Ligand Set



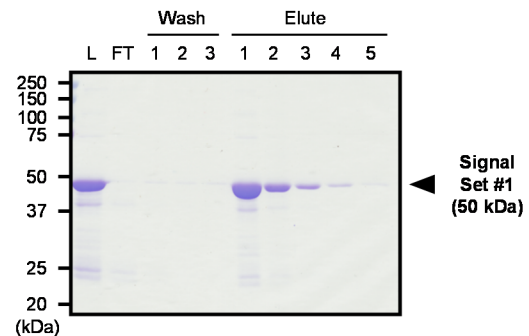
(B) Mouse Ligand Set



(C) Receptor Set



(D) Signal Set #1



(E) Signal Set #2

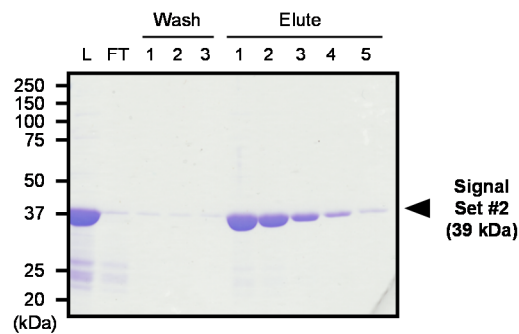


Fig. 6-6 Purification of stable isotope labeled proteins with C-terminal HAT tag
Elute fractions after N-terminal purification were collected, and then purified by passing through HisPurTM Cobalt Spin Columns (Thermo Fisher Scientific, IL, USA). Purified stable isotope-labeled proteins were electrophoresed on 10% SDS-polyacrylamide gel and stained with Coomassie Brilliant Blue R-250. L: Load protein sample, FT: Flow-through fraction.

C 末端側アフィニティ精製用タグを用いた精製後の SDS-PAGE の結果、目的分子量サイズにバンドが認められた elute fraction を回収することで精製済み安定同位元素標識内標準タンパク質溶液とした。このタンパク質溶液に対して限外濾過カラムを用いた脱塩濃縮を行った後に、lysylendopeptidase および trypsin を用いた酵素消化を行い、LC-MS/MS を用いて回収量の測定を行った。回収量の測定を行うにあたり定量対象としたペプチドは、N 末端側に配置したモニタリングペプチド(Monitoring peptide N-terminal)および C 末端側に配置したモニタリングペプチド(Monitoring peptide C-terminal)である(Fig. 6-2)。回収量測定の結果、全てのタンパク質で N 末端側(Monitoring peptide N-terminal)と比較して C 末端側(Monitoring peptide C-terminal)の定量値が低いという結果となった(Table 6-2)。今回合成を行ったタンパク質の中でも Signal Set #2 に関しては両ペプチド定量値の比(Monitoring peptide N-terminal / Monitoring peptide C-terminal)が 97.8%となったためほぼ精製が行えていることが示唆されたが、特に Human Ligand Set に関しては Monitoring peptide N-terminal / Monitoring peptide C-terminal の値が 40.7% となり、C 末端側精製が不十分であることが示唆された。

Table 6-2 Recovered protein amount of stable isotope-labeled proteins after purification with N-terminal and C-terminal tag

	Mean \pm SEM (pmol)		Ratio (%) N-terminal/C-terminal
	Monitoring peptide N-terminal	Monitoring peptide C-terminal	
Human Ligand Set	1461 \pm 20	594 \pm 13	40.7
Mouse Ligand Set	575 \pm 4	407 \pm 5	70.8
Receptor Set	14.4 \pm 0.2	8.51 \pm 0.17	59.0
Signal Set #1	73.7 \pm 3.0	56.0 \pm 1.1	75.9
Signal Set #2	642 \pm 6	627 \pm 11	97.8

Each value represents recovered protein amount of each protein synthesized by cell free system (the mean \pm S.E.M., n=12 SRM/MRM transitions). The protein amount determined as the average of 12 quantitative values from four SRM/MRM transitions of three analyses.

6-2-2. 分子標的薬感受性関連分子一斉定量の測定条件最適化

合成および精製を行った各安定同位元素標識タンパク質(Human Ligand Set, Mouse Ligand Set, Receptor Set, Signal Set #1, Signal Set #2)の酵素消化産物を用いて、高感度に検出される 4 種類のプロダクトイオン(Q3)、declustering potential (DP)および collision energy (CE)を最適値として選択し、イオン化条件の最適化を行った(Table 6-3)。Table 6-2 に示した各タンパク質の回収量の中でも C 末端側に配置されている Monitoring peptide C-terminal (Fig. 6-2)から算出した回収量が全長合成されたタンパク質量であると考えられるため、Monitoring peptide C-terminal から算出した回収量に基づき 100 fmol/injection となるように LC-MS/MS を用いて分離検出および最適化を行った。各タンパク質は dithiothreitol で還元し、iodoacetamide を用いてカルバミドメチル化を行った後に酵素消化を行っている。従って、cysteine を含むペプチドに関してはカルバミドメチル化体としての m/z を設定した。また、methionine を含むペプチドに関しては H_2O_2 を用いて酸化を行い、methionine sulfoxide での m/z を設定した。

最適化の結果、Human Ligand Set では 38 ペプチド中 22 ペプチド、Mouse Ligand Set では 27 ペプチド中 16 ペプチド、Receptor Set では 50 ペプチド中 48 ペプチド、Signal Set #1 では 32 ペプチド中 27 ペプチド、Signal Set #2 では 25 ペプチド中 23 ペプチドで LC-MS/MS を用いた検出が可能であることが示唆された(Table 6-3)。なお、ピークが検出されず最適化が行えなかったペプチドに関しては各 Table 中で”N.D.”と記載している。

また、最適化においてピークの検出が認められた各安定同位元素標識ペプチドに関して安定同位元素標識純度を解析した。一定量(100 fmol/injection)の安定同位元素標識 Human Ligand Set 消化物、Mouse Ligand Set 消化物、Receptor Set 消化物、Signal Set #1 消化物、Signal Set #2 消化物に関してそれぞれ単独で LC-MS/MS 測定を行い、非標識体の SRM/MRM transition において検出されたピ

ークを用いて安定同位元素標識純度を算出した。結果、**Table 6-4** に示す通り標識純度は各ペプチドにおいて 98.6-100.0%の範囲であることが認められた。

Table 6-3 Results of optimization for quantification of proteins in each protein set

Peptide name	Species	Optimization	Peptide name	Species	Optimization	Peptide name	Species	Optimization	Peptide name	Species	Optimization
<u>Human Ligand Set (N>>> C-terminal)</u>			<u>Mouse Ligand Set (N>>> C-terminal)</u>			<u>Receptor Set (N>>> C-terminal)</u>			<u>Signal Set #1 (N>>> C-terminal)</u>		
EGF	Hu	N.D	Heparin-binding EGF	Mo	N.D	EGFR-all	Hu	Optimized	PTEN	Hu / Mo	Optimized
Heparin-binding EGF	Hu	Optimized	Amphiregulin (AR)	Mo	N.D	EGFR-WT, vII,IV,V	Hu	Optimized	AKT1-pep1	Hu	Optimized
Amphiregulin (AR)	Hu	N.D	Betacellulin (BTC)	Mo	N.D	EGFR-WT, vII-V	Hu	Optimized	AKT1-pep2	Hu / Mo	Optimized
Epiregulin (EPR)	Hu	Optimized	Epiregulin (EPR)	Mo	Optimized	ERBB2-pep1	Hu	Optimized	AKT2-pep1	Hu	Optimized
Epigen	Hu	Optimized	Epigen	Mo	N.D	ERBB2-pep2	Hu	Optimized	AKT2-pep2	Hu	N.D
PDGF-A	Hu	N.D	PDGF-C-pep1	Mo	Optimized	ERBB3-pep1	Hu	Optimized	AKT3-pep1	Hu / Mo	Optimized
TGF- α	Hu	N.D	PDGF-C-pep2	Mo	Optimized	ERBB3-pep2	Hu	Optimized	PIK3CA-pep1	Hu	Optimized
PDGF-B	Hu / Mo	N.D	PDGF-D-pep1	Mo	Optimized	ERBB4-pep1	Hu	Optimized	mTOR-pep1	Hu	Optimized
PDGF-C-pep1	Hu	Optimized	PDGF-D-pep2	Mo	Optimized	ERBB4-pep2	Hu	Optimized	PIK3CA-pep2	Hu / Mo	Optimized
PDGF-C-pep2	Hu	Optimized	VEGF-B	Mo	Optimized	VEGFR1-pep1	Hu	Optimized	mTOR-pep2	Hu	N.D
PDGF-D-pep1	Hu	Optimized	VEGF-C	Mo	Optimized	VEGFR1-pep2	Hu	Optimized	RAPTOR-pep1	Hu	Optimized
PDGF-D-pep2	Hu	N.D	VEGF-D-pep1	Mo	Optimized	VEGFR2-pep1	Hu	Optimized	AKT3-pep2	Hu / Mo	Optimized
VEGF-A-pep1	Hu	N.D	VEGF-D-pep2	Mo	Optimized	VEGFR2-pep2	Hu	Optimized	RAPTOR-pep2	Hu	Optimized
VEGF-A-pep2	Hu	N.D	NRTN-pep1	Mo	Optimized	PDGFR α -pep1	Hu	Optimized	RICTOR-pep1	Hu	Optimized
VEGF-B	Hu	N.D	SCF-pep1	Mo	Optimized	PDGFR α -pep2	Hu	Optimized	RICTOR-pep2	Hu	Optimized
VEGF-C	Hu	Optimized	SCF-pep2	Mo	N.D	PDGFR β -pep1	Hu	Optimized	ARAF-pep2	Hu	Optimized
VEGF-D-pep1	Hu	Optimized	FL-pep1	Mo	Optimized	PDGFR β -pep2	Hu	Optimized	KRAS	Hu / Mo	Optimized
VEGF-D-pep2	Hu	Optimized	FL-pep2	Mo	Optimized	c-kit-pep1	Hu	Optimized	NF1-pep1	Hu / Mo	Optimized
FL-pep1	Hu	Optimized	HGF-pep1	Mo	N.D	c-kit-pep2	Hu	Optimized	NF1-pep2	Hu / Mo	Optimized
FL-pep2	Hu	Optimized	TGF- α	Mo	N.D	FLT3-pep1	Hu	Optimized	ARAF-pep1	Hu	Optimized
HGF-pep1	Hu	Optimized	HGF-pep2	Mo	N.D	CD33-pep1	Hu	Optimized	BRAF-pep1	Hu / Mo	Optimized
HGF-pep2	Hu	N.D	GDNF	Mo	N.D	CD33-pep2	Hu	Optimized	BRAF-pep2	Hu / Mo	N.D
IGF-1	Hu / Mo	Optimized	NRTN-pep2	Mo	N.D	CD37-pep1	Hu	Optimized	CRAF-pep1	Hu	Optimized
IGF-2-pep1	Hu / Mo	N.D	ARTN-pep1	Mo	Optimized	CD37-pep2	Hu	Optimized	CRAF-pep2	Hu	Optimized
IGF-2-pep2	Hu / Mo	N.D	ARTN-pep2	Mo	Optimized	MET-pep1	Hu	Optimized	MEK1-pep1	Hu / Mo	Optimized
NRTN-pep1	Hu	Optimized	PSPN-pep1	Mo	Optimized	MET-pep2	Hu	Optimized	MEK1-pep2	Hu / Mo	Optimized
NRTN-pep2	Hu	Optimized	PSPN-pep2	Mo	N.D	IGFR-pep1	Hu	Optimized	MEK2-pep1	Hu	N.D
ARTN	Hu	Optimized				IGFR-pep2	Hu / Mo	Optimized	MEK2-pep2	Hu	N.D
PSPN-pep1	Hu	Optimized				FGFR1	Hu / Mo	Optimized	ERK1	Hu / Mo	Optimized
PSPN-pep2	Hu	Optimized				FGFR2-pep1	Hu / Mo	Optimized	ERK2	Hu / Mo	Optimized
NRG1	Hu	N.D				FGFR2-pep2	Hu / Mo	Optimized	GRB2-pep1	Hu / Mo	Optimized
NRG2	Hu / Mo	N.D				FGFR3-pep1	Hu	N.D	GRB2-pep2	Hu / Mo	Optimized
NRG3	Hu / Mo	Optimized				FGFR3-pep2	Hu / Mo	Optimized			
NRG4	Hu	Optimized				FGFR4-pep1	Hu	Optimized	<u>Signal Set #2 (N>>> C-terminal)</u>		
FGF1-pep1	Hu / Mo	Optimized				FGFR4-pep2	Hu	N.D	STAT1-pep1	Hu	Optimized
SCF	Hu	N.D				RET-pep1	Hu	Optimized	STAT1-pep2	Hu	Optimized
FGF1-pep2	Hu / Mo	N.D				RET-pep2	Hu	Optimized	STAT2-pep1	Hu	Optimized
FGF2	Hu / Mo	Optimized				FAK1-pep1	Hu	Optimized	STAT2-pep2	Hu	Optimized
						FAK1-pep2	Hu	Optimized	STAT3-pep1	Hu / Mo	Optimized
						FAK2-pep1	Hu	Optimized	STAT3-pep2	Hu / Mo	Optimized
						FAK2-pep2	Hu	Optimized	STAT4-pep1	Hu	Optimized
						VEGFR1-pep1	Mo	Optimized	STAT5B	Hu	Optimized
						VEGFR1-pep2	Mo	Optimized	STAT5A-pep2	Hu / Mo	Optimized
						VEGFR2-pep1	Mo	Optimized	STAT6-pep1	Hu	Optimized
						VEGFR2-pep2	Mo	Optimized	STAT6-pep2	Hu	Optimized
						PDGFR α -pep1	Mo	Optimized	HSP90 α -pep1	Hu / Mo	Optimized
						PDGFR α -pep2	Mo	Optimized	HSP90 α -pep2	Hu / Mo	N.D
						FLT3-pep2	Hu	Optimized	SRC-pep1	Hu / Mo	N.D
						PDGFR β -pep1	Mo	Optimized	SRC-pep2	Hu / Mo	Optimized
						PDGFR β -pep2	Mo	Optimized	LCK-pep1	Hu / Mo	Optimized
									LCK-pep2	Hu / Mo	Optimized
									LYN-pep1	Hu	Optimized
									LYN-pep2	Hu / Mo	Optimized
									STAT5A-pep1	Hu / Mo	Optimized
									FYN-pep2	Hu / Mo	Optimized
									LYK-pep1	Hu	Optimized
									LYK-pep2	Hu	Optimized
									FYN-pep1	Hu / Mo	Optimized
									STAT4-pep2	Hu	Optimized

Typically, doubly, triply, or quadruply charged precursor ions were selected (Q1). Four SRM/MRM transitions per peptide, corresponding to high-intensity fragment ions, were selected. N.D.: Not detected.

Table 6-4 Purity of stable isotope-labeled peptide

Peptide name	Species	Labeling index (%)	Peptide name	Species	Labeling index (%)	Peptide name	Species	Labeling index (%)
<u>Human Ligand Set (N>>> C-terminal)</u>			<u>Receptor Set (N>>> C-terminal)</u>			<u>Signal Set #1 (N>>> C-terminal)</u>		
Heparin-binding EGF	Hu	99.5	EGFR-all	Hu	99.6	PTEN	Hu / Mo	99.6
Epiregulin (EPR)	Hu	99.8	EGFR-WT,vII,IV,V	Hu	99.3	AKT1-pep1	Hu	99.2
Epigen	Hu	99.9	EGFR-WT,vII~V	Hu	99.9	AKT1-pep2	Hu / Mo	99.9
PDGF-C-pep1	Hu	99.7	ERBB2-pep1	Hu	99.9	AKT2-pep1	Hu	99.8
PDGF-C-pep2	Hu	99.7	ERBB2-pep2	Hu	99.6	AKT3-pep1	Hu / Mo	100.0
PDGF-D-pep1	Hu	99.7	ERBB3-pep1	Hu	99.8	PIK3CA-pep1	Hu	99.6
VEGF-C	Hu	99.2	ERBB3-pep2	Hu	99.4	mTOR-pep1	Hu	99.8
VEGF-D-pep1	Hu	99.5	ERBB4-pep1	Hu	99.6	PIK3CA-pep2	Hu / Mo	99.4
VEGF-D-pep2	Hu	99.3	ERBB4-pep2	Hu	99.8	RAPTOR-pep1	Hu	98.8
FL-pep1	Hu	99.4	VEGFR1-pep1	Hu	99.9	AKT3-pep2	Hu / Mo	98.9
FL-pep2	Hu	99.9	VEGFR1-pep2	Hu	100.0	RAPTOR-pep2	Hu	99.7
HGF-pep1	Hu	99.1	VEGFR2-pep1	Hu	99.1	RICTOR-pep1	Hu	99.6
IGF-1	Hu / Mo	99.8	VEGFR2-pep2	Hu	99.8	RICTOR-pep2	Hu	99.4
NRTN-pep1	Hu	99.7	PDGFRa-pep1	Hu	98.8	ARAF-pep2	Hu	99.3
NRTN-pep2	Hu	99.1	PDGFRa-pep2	Hu	98.7	KRAS	Hu / Mo	98.8
ARTN	Hu	99.9	PDGFRβ-pep1	Hu	99.0	NF1-pep1	Hu / Mo	99.4
PSPN-pep1	Hu	99.2	PDGFRβ-pep2	Hu	99.8	NF1-pep2	Hu / Mo	99.0
PSPN-pep2	Hu	99.8	c-kit-pep1	Hu	99.8	ARAF-pep1	Hu	99.6
NRG3	Hu / Mo	99.1	c-kit-pep2	Hu	99.5	BRAF-pep1	Hu / Mo	99.4
NRG4	Hu	99.6	FLT3-pep1	Hu	99.3	CRAF-pep1	Hu	99.8
FGF1-pep1	Hu / Mo	100.0	CD33-pep1	Hu	99.8	CRAF-pep2	Hu	98.9
FGF2	Hu / Mo	99.4	CD33-pep2	Hu	99.8	MEK1-pep1	Hu / Mo	99.2
			CD37-pep1	Hu	99.9	MEK1-pep2	Hu / Mo	99.6
			CD37-pep2	Hu	99.5	ERK1	Hu / Mo	99.8
<u>Mouse Ligand Set (N>>> C-terminal)</u>			MET-pep1	Hu	99.7	ERK2	Hu / Mo	99.9
Epiregulin (EPR)	Mo	99.9	MET-pep2	Hu	98.9	GRB2-pep1	Hu / Mo	99.7
PDGF-C-pep1	Mo	99.9	IGFR-pep1	Hu	99.9	GRB2-pep2	Hu / Mo	99.8
PDGF-C-pep2	Mo	99.9	IGFR-pep2	Hu / Mo	99.1			
PDGF-D-pep1	Mo	99.7	FGFR1	Hu / Mo	99.2	<u>Signal Set #2 (N>>> C-terminal)</u>		
PDGF-D-pep2	Mo	99.2	FGFR2-pep1	Hu / Mo	99.1	STAT1-pep1	Hu	99.4
VEGF-B	Mo	99.7	FGFR2-pep2	Hu / Mo	99.2	STAT1-pep2	Hu	99.3
VEGF-C	Mo	99.8	FGFR3-pep2	Hu / Mo	99.5	STAT2-pep1	Hu	99.1
VEGF-D-pep1	Mo	99.5	FGFR4-pep1	Hu	99.0	STAT2-pep2	Hu	99.8
VEGF-D-pep2	Mo	99.1	RET-pep1	Hu	99.8	STAT3-pep1	Hu / Mo	99.9
NRTN-pep1	Mo	99.3	RET-pep2	Hu	99.6	STAT3-pep2	Hu / Mo	99.7
SCF-pep1	Mo	99.1	FAK1-pep1	Hu	99.3	STAT4-pep1	Hu	99.9
FL-pep1	Mo	99.7	FAK1-pep2	Hu	99.7	STAT5B	Hu	99.9
FL-pep2	Mo	99.6	FAK2-pep1	Hu	99.6	STAT5A-pep2	Hu / Mo	99.4
ARTN-pep1	Mo	99.3	FAK2-pep2	Hu	99.1	STAT6-pep1	Hu	98.6
ARTN-pep2	Mo	99.8	VEGFR1-pep1	Mo	99.8	STAT6-pep2	Hu	99.9
PSPN-pep1	Mo	99.4	VEGFR1-pep2	Mo	99.9	HSP90a-pep1	Hu / Mo	99.8
			VEGFR2-pep1	Mo	99.7	SRC-pep2	Hu / Mo	99.8
			VEGFR2-pep2	Mo	99.0	LCK-pep1	Hu / Mo	99.9
			PDGFRa-pep1	Mo	99.8	LCK-pep2	Hu / Mo	98.9
			PDGFRa-pep2	Mo	100.0	LYN-pep1	Hu	99.9
			FLT3-pep2	Hu	99.5	LYN-pep2	Hu / Mo	99.1
			PDGFRβ-pep1	Mo	98.9	STAT5A-pep1	Hu / Mo	99.9
			PDGFRβ-pep2	Mo	99.4	FYN-pep2	Hu / Mo	99.6
						LYK-pep1	Hu	98.8
						LYK-pep2	Hu	99.0
						FYN-pep1	Hu / Mo	99.3
						STAT4-pep2	Hu	99.9

Labeling index: Purity of stable isotope-labeled peptide (%)

6-2-3. 悪性脳腫瘍 xenograft における分子標的薬感受性関連分子一斉定量

米国 Mayo Clinic から提供を受けた GBM xenograft line の whole cell lysate を用いて Human Ligand Set および Mouse Ligand Set に含まれる分子の発現解析を行った。各検体の詳細に関しては第 4 章 89 ページの **Table 4-1** に示した。LC-MS/MS を用いた発現解析に関しては、各サンプルに一定量(100 fmol/injection)の安定同位元素標識 Human Ligand Set 消化物または Mouse Ligand Set 消化物を内標準ペプチドとして添加し、検量線を用いずに内標準ペプチドとのピーク面積比から定量値を算出した。発現解析の結果、FGF1-pep1_Hu/Mo のみ GBM12 を除く 5 検体で発現が認められ、その他の分子に関しては全て発現が認められなかった (**Table 6-5**)。なお、**Table 6-5** で*を付けた定量値は各測定で設定した 4 つの SRM/MRM transition のうち 2 つの SRM/MRM transition でピークが検出されたものであり、信頼性に劣る定量値として記載している。

Table 6-5 Expression of receptor ligand proteins in whole cell lysate of six GBM xenograft lines (Human Ligand Set and Mouse Ligand Set)

	Quantitative value in whole cell lysate (fmol/ug protein)					
	MayoGBM6	MayoGBM8	MayoGBM10	MayoGBM12	MayoGBM22	MayoGBM39
<i>Human Ligand Set</i>						
Heparin-binding EGF_Hu	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.
Epiregulin (EPR)_Hu	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.
Epigen_Hu	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.
PDGF-C-pep1_Hu	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.
PDGF-C-pep2_Hu	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.
PDGF-D-pep1_Hu	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.
VEGF-C_Hu	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.
VEGF-D-pep1_Hu	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.
VEGF-D-pep2_Hu	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.
NRG3_Hu/Mo	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.
NRG4_Hu	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.
FL-pep1_Hu	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.
FL-pep2_Hu	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.
HGF-pep1_Hu	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.
IGF-1_Hu/Mo	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.
NRTN-pep1_Hu	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.
NRTN-pep2_Hu	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.
ARTN_Hu	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.
PSPN-pep1_Hu	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.
PSPN-pep2_Hu	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.
FGF1-pep1_Hu/Mo	0.367 ± 0.050	1.41 ± 0.10	0.976 ± 0.074	U.L.Q.	0.396 ± 0.052 *	1.32 ± 0.16
FGF2_Hu/Mo	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.
<i>Mouse Ligand Set</i>						
Epiregulin (EPR)_Mo	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.
PDGF-C-pep1_Mo	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.
PDGF-C-pep2_Mo	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.
PDGF-D-pep1_Mo	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.
PDGF-D-pep2_Mo	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.
VEGF-B_Mo	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.
VEGF-C_Mo	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.
VEGF-D-pep1_Mo	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.
VEGF-D-pep2_Mo	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.
SCF-pep1_Mo	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.
FL-pep1_Mo	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.
FL-pep2_Mo	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.
NRTN-pep1_Mo	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.
ARTN-pep1_Mo	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.
ARTN-pep2_Mo	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.
PSPN-pep1_Mo	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.

Whole cell lysate of GBM xenograft lines were analyzed by multiplexed-SRM/MRM analysis using LC-MS/MS. The quantitative values were calculated from peak area ratio of endogenous peptides to stable isotope-labeled peptides as internal standards. The expression amount of each molecule was determined as the average of two to four quantitative values from four SRM/MRM transitions of one analysis. Each value represents the mean ± S.E.M. (n=2-4 SRM/MRM transitions). U.L.Q. means “under limit of quantification.” *The reliability of the calculated values was considered to be lower than other detected molecules, since only two among four SRM/MRM transitions gave the detectable peaks over 5,000 counts.

GBM xenograft line の plasma membrane fraction を用いて Receptor Set に含まれる分子の発現解析を行った結果を **Table 6-6** に示す。先程と同様に、各サンプルに一定量(100 fmol/injection)の安定同位元素標識 Receptor Set 消化物を内標準ペプチドとして添加し、検量線を用いずに内標準ペプチドとのピーク面積比から定量値を算出した。発現解析の結果、EGFR 関連ペプチド 3 種類および FAK1-pep2_Hu の発現が全ての検体で発現が認められた(**Table 6-6**)。また、IGFR-pep1_Hu および IGFR-pep2_Hu/Mo に関しては GBM39 を除く 5 検体で発現が認められた。さらに、一部の検体において発現が認められた分子としては ERBB2-pep1_Hu, ERBB2-pep2_Hu, PDGFR α -pep1_Hu, PDGFR α -pep2_Hu, PDGFR β -pep1_Hu, PDGFR β -pep2_Hu, MET-pep2_Hu, RET-pep1_Hu, RET-pep2_Hu, FAK1-pep1_Hu, FAK1-pep2_Hu が挙げられた。一方で、マウス由来の分子を特異的に検出するペプチドの中では PDGFR β -pep1_Mo の発現が全ての検体で認められ、解析を行った組織検体にはマウス由来の PDGFR β が発現していることが示唆された(**Table 6-6**)。なお、**Table 6-6** で*を付けた定量値は各測定で設定した 4 つの SRM/MRM transition のうち 2 つの SRM/MRM transition でピークが検出されたものであり、信頼性に劣る定量値として記載している。

Table 6-6 Expression of receptor proteins in plasma membrane fraction of six GBM xenograft lines (Receptor Set)

	Quantitative value in plasma membrane fraction (fmol/ug protein)					
	MayoGBM6	MayoGBM8	MayoGBM10	MayoGBM12	MayoGBM22	MayoGBM39
<i>Human specific or human/mouse common</i>						
EGFR-all_Hu	28.0 ± 0.7	108 ± 4	5.12 ± 0.19	17.6 ± 0.5	4.14 ± 0.25	57.6 ± 1.3
EGFR-WT,vII,IV,V_Hu	2.16 ± 0.13	115 ± 4	5.06 ± 0.10	18.6 ± 0.5	4.07 ± 0.07	3.66 ± 0.11
EGFR-WT,vII~V_Hu	29.7 ± 0.2	112 ± 4	5.01 ± 0.20	19.4 ± 0.9	4.09 ± 0.16	61.3 ± 1.4
ERBB2-pep1_Hu	0.377 ± 0.133 *	0.530 ± 0.134 *	0.415 ± 0.085 *	U.L.Q.	0.186 ± 0.019 *	U.L.Q.
ERBB2-pep2_Hu	0.250 ± 0.074 *	0.287 ± 0.002 *	0.430 ± 0.046 *	U.L.Q.	0.197 ± 0.076 *	U.L.Q.
ERBB3-pep1_Hu	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.
ERBB3-pep2_Hu	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.
ERBB4-pep1_Hu	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.
ERBB4-pep2_Hu	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.
VEGFR1-pep1_Hu	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.
VEGFR1-pep2_Hu	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.
VEGFR2-pep1_Hu	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.
VEGFR2-pep2_Hu	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.
PDGFRα-pep1_Hu	9.80 ± 0.91	U.L.Q.	U.L.Q.	42.5 ± 4.7	U.L.Q.	U.L.Q.
PDGFRα-pep2_Hu	11.6 ± 1.1	1.73 ± 0.19 *	3.42 ± 0.43	45.4 ± 5.6	U.L.Q.	U.L.Q.
PDGFRβ-pep1_Hu	0.290 ± 0.067 *	U.L.Q.	0.732 ± 0.077	U.L.Q.	0.641 ± 0.130	U.L.Q.
PDGFRβ-pep2_Hu	U.L.Q.	U.L.Q.	0.667 ± 0.182	U.L.Q.	0.491 ± 0.110	U.L.Q.
c-kit-pep1_Hu	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.
c-kit-pep2_Hu	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.
FLT3-pep1_Hu	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.
FLT3-pep2_Hu	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.
CD33-pep1_Hu	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.
CD33-pep2_Hu	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.
CD37-pep1_Hu	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.
CD37-pep2_Hu	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.
MET-pep1_Hu	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.
MET-pep2_Hu	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	1.00 ± 0.09	0.983 ± 0.043
IGFR-pep1_Hu	0.737 ± 0.060	0.582 ± 0.044	0.623 ± 0.055	0.644 ± 0.042	0.451 ± 0.021	U.L.Q.
IGFR-pep2_Hu/Mo	1.20 ± 0.09	1.33 ± 0.14	1.34 ± 0.08 *	0.834 ± 0.062	0.928 ± 0.088	U.L.Q.
FGFR1_Hu/Mo	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.
FGFR2-pep1_Hu/Mo	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.
FGFR2-pep2_Hu/Mo	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.
FGFR3-pep2_Hu/Mo	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.
FGFR4-pep1_Hu	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.
RET-pep1_Hu	0.258 ± 0.019	0.162 ± 0.030	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.
RET-pep2_Hu	0.379 ± 0.074	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.
FAK1-pep1_Hu	U.L.Q.	U.L.Q.	1.22 ± 0.09 *	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.
FAK1-pep2_Hu	0.592 ± 0.009 *	0.639 ± 0.040 *	2.27 ± 0.11	0.522 ± 0.047 *	0.292 ± 0.041 *	1.09 ± 0.01 *
FAK2-pep1_Hu	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.
FAK2-pep2_Hu	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.
<i>Mouse specific</i>						
VEGFR1-pep1_Mo	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.
VEGFR1-pep2_Mo	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.
VEGFR2-pep1_Mo	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.
VEGFR2-pep2_Mo	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.
PDGFRα-pep1_Mo	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.
PDGFRα-pep2_Mo	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.
PDGFRβ-pep1_Mo	0.688 ± 0.082 *	0.825 ± 0.050 *	2.07 ± 0.31 *	0.743 ± 0.189 *	0.425 ± 0.050 *	1.07 ± 0.03 *
PDGFRβ-pep2_Mo	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.

Plasma membrane fraction of GBM xenograft lines were analyzed by multiplexed-SRM/MRM analysis using LC-MS/MS. The quantitative values were calculated from peak area ratio of endogenous peptides to stable isotope-labeled peptides as internal standards. The expression amount of each molecule was determined as the average of two to four quantitative values from four SRM/MRM transitions of one analysis. Each value represents the mean ± S.E.M. (n=2-4 SRM/MRM transitions). U.L.Q. means “under limit of quantification.” *The reliability of the calculated values was considered to be lower than other detected molecules, since only two among four SRM/MRM transitions gave the detectable peaks over 5,000 counts.

GBM xenograft line の whole cell lysate を用いて Signal Set #1 および Signal Set#2 に含まれる分子の発現解析を行った結果を **Table 6-7** に示す。先程と同様に、各サンプルに一定量(100 fmol/injection)の安定同位元素標識 Signal Set #1 消化物または Signal Set #2 消化物を内標準ペプチドとして添加し、検量線を用いずに内標準ペプチドとのピーク面積比から定量値を算出した。発現解析の結果、PI3K/AKT 経路に関連する分子の中では AKT1-pep1_Hu, AKT1-pep2_Hu/Mo, AKT3-pep1_Hu/Mo, RAPTOR-pep2_Hu の発現が認められた(**Table 6-7**)。MAPK 経路に関連する分子の中では、KRAS_Hu/Mo, MEK1-pep1_Hu/Mo, MEK1-pep2_Hu/Mo, ERK1_Hu/Mo, ERK2_Hu/Mo, GRB2-pep1_Hu/Mo, GRB2-pep2_Hu/Mo の発現が認められた(**Table 6-7**)。特に、MEK1-pep2_Hu/Mo, ERK1_Hu/Mo, ERK2_Hu/Mo に関しては全ての検体で発現が認められた。その他の経路に関連する分子の中では STAT1-pep1_Hu, STAT1-pep2_Hu, STAT2-pep2_Hu, STAT3-pep1_Hu/Mo, STAT3-pep2_Hu/Mo, STAT5A-pep2_Hu/Mo, HSP90 α -pep1_Hu/Mo, SRC-pep2_Hu/Mo, LYN-pep1_Hu, FYN-pep1_Hu/Mo の発現が認められた(**Table 6-7**)。これらの分子の中でも HSP90 α -pep1_Hu/Mo に関しては全ての検体で発現が認められ、かつ発現量が 31.8~68.8 fmol/ μ g protein であることから、今回解析を行った分子の中でも非常に高発現していることが認められた。なお、**Table 6-7** で*を付けた定量値は各測定で設定した 4 つの SRM/MRM transition のうち 2 つの SRM/MRM transition でピークが検出されたものであり、信頼性に劣る定量値として記載している。

Table 6-7 Expression of receptor ligand proteins in whole cell lysate of six GBM xenograft lines (Signal Set #1 and Signal Set #2)

	Quantitative value in whole cell lysate (fmol/ug protein)					
	MayoGBM6	MayoGBM8	MayoGBM10	MayoGBM12	MayoGBM22	MayoGBM39
<i>PI3K/AKT pathway</i>						
PTEN_Hu/Mo	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.
AKT1-pep1_Hu	U.L.Q.	1.49 ± 0.32	1.36 ± 0.44 *	1.31 ± 0.30 *	U.L.Q.	U.L.Q.
AKT1-pep2_Hu/Mo	0.719 ± 0.010	1.02 ± 0.09	0.695 ± 0.006 *	0.939 ± 0.040	U.L.Q.	U.L.Q.
AKT2-pep1_Hu	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.
AKT3-pep1_Hu/Mo	0.241 ± 0.018 *	0.244 ± 0.019	U.L.Q.	0.251 ± 0.014	0.116 ± 0.021 *	0.235 ± 0.043
AKT3-pep2_Hu/Mo	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.
mTOR-pep1_Hu	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.
PIK3CA-pep1_Hu	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.
PIK3CA-pep2_Hu/Mo	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.
RAPTOR-pep1_Hu	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.
RAPTOR-pep2_Hu	U.L.Q.	0.436 ± 0.032 *	0.483 ± 0.054 *	U.L.Q.	U.L.Q.	0.409 ± 0.039 *
RICTOR-pep1_Hu	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.
RICTOR-pep2_Hu	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.
<i>MAPK pathway</i>						
KRAS_Hu/Mo	1.20 ± 0.35 *	1.43 ± 0.14	1.47 ± 0.04	U.L.Q.	U.L.Q.	2.13 ± 0.45
ARAF-pep1_Hu	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.
ARAF-pep2_Hu	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.
BRAF-pep1_Hu/Mo	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.
CRAF-pep1_Hu	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.
CRAF-pep2_Hu	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.
MEK1-pep1_Hu/Mo	9.72 ± 2.27	4.16 ± 1.11 *	9.63 ± 1.22	2.91 ± 0.74 *	U.L.Q.	6.89 ± 0.58 *
MEK1-pep2_Hu/Mo	3.99 ± 0.25	1.32 ± 0.08	3.76 ± 0.12	1.40 ± 0.19	2.41 ± 0.25	1.53 ± 0.09
ERK1_Hu/Mo	1.28 ± 0.16	1.60 ± 0.23	2.28 ± 0.13	1.21 ± 0.21	1.79 ± 0.11	2.63 ± 0.16
ERK2_Hu/Mo	5.92 ± 0.10	7.57 ± 0.15	3.37 ± 0.27	3.00 ± 0.19	3.45 ± 0.12	3.54 ± 0.24
GRB2-pep1_Hu/Mo	1.27 ± 0.05 *	0.773 ± 0.027 *	2.09 ± 0.43	U.L.Q.	U.L.Q.	1.34 ± 0.16
GRB2-pep2_Hu/Mo	U.L.Q.	U.L.Q.	2.17 ± 0.13 *	1.78 ± 0.23 *	U.L.Q.	U.L.Q.
NF1-pep1_Hu/Mo	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.
NF1-pep2_Hu/Mo	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.
<i>Other pathway</i>						
STAT1-pep1_Hu	1.20 ± 0.07	1.47 ± 0.12	U.L.Q.	U.L.Q.	2.24 ± 0.24	2.03 ± 0.15
STAT1-pep2_Hu	2.99 ± 0.08	4.91 ± 0.61	1.56 ± 0.13 *	1.54 ± 0.45	5.88 ± 0.44	6.20 ± 0.61
STAT2-pep1_Hu	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.
STAT2-pep2_Hu	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	1.74 ± 0.21	0.927 ± 0.105 *
STAT3-pep1_Hu/Mo	0.638 ± 0.052	1.47 ± 0.26	2.08 ± 0.20	0.540 ± 0.005	0.803 ± 0.065	1.96 ± 0.20
STAT3-pep2_Hu/Mo	U.L.Q.	1.01 ± 0.12	1.58 ± 0.10	U.L.Q.	0.714 ± 0.010 *	1.50 ± 0.22
STAT4-pep1_Hu	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.
STAT4-pep2_Hu	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.
STAT5A-pep1_Hu/Mo	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.
STAT5A-pep2_Hu/Mo	U.L.Q.	8.11 ± 0.11 *	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.
STAT5B_Hu	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.
STAT6-pep1_Hu	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.
STAT6-pep2_Hu	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.
HSP90α-pep1_Hu/Mo	34.0 ± 3.4	44.8 ± 2.2	68.8 ± 0.6	39.3 ± 1.2	42.5 ± 1.0	31.8 ± 1.8
SRC-pep2_Hu/Mo	0.484 ± 0.032	0.379 ± 0.071 *	0.338 ± 0.024	0.187 ± 0.007 *	0.669 ± 0.063	0.348 ± 0.055 *
LCK-pep1_Hu/Mo	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.
LCK-pep2_Hu/Mo	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.
LYN-pep1_Hu	U.L.Q.	0.542 ± 0.050	0.363 ± 0.074	U.L.Q.	0.640 ± 0.141	U.L.Q.
LYN-pep2_Hu/Mo	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.
LYK-pep1_Hu	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.
LYK-pep2_Hu	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.
FYN-pep1_Hu/Mo	1.79 ± 0.09	1.48 ± 0.04	1.05 ± 0.07	U.L.Q.	0.894 ± 0.100 *	1.61 ± 0.15
FYN-pep2_Hu/Mo	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.	U.L.Q.

Whole cell lysate of GBM xenograft lines were analyzed by multiplexed-SRM/MS analysis using LC-MS/MS. The quantitative values were calculated from peak area ratio of endogenous peptides to stable isotope-labeled peptides as internal standards. The expression amount of each molecule was determined as the average of two to four quantitative values from four SRM/MS transitions of one analysis. Each value represents the mean ± S.E.M. (n=2-4 SRM/MS transitions). U.L.Q. means “under limit of quantification.” *The reliability of the calculated values was considered to be lower than other detected molecules, since only two among four SRM/MS transitions gave the detectable peaks over 5,000 counts.

第3節 考察

本研究では分子標的薬の感受性に関与すると考えられる分子の定量用ペプチドを数珠つなぎにした安定同位元素標識内標準タンパク質を人工的に作製し、この合成タンパク質を用いることで GBM xenograft line における分子標的薬感受性関連分子の一斉定量を行った。

Ligand Set を用いた増殖因子受容体リガンド分子の発現解析の結果、FGF1 のみ GBM xenograft line において発現が認められ、その他の分子は全て発現が認められなかった(**Table 6-5**)。これらリガンドは細胞外へと放出された後に速やかに各受容体に結合することで内在化および分解されるため(Harris *et al.*, 2003, Oshima *et al.*, 2012)、多くのリガンド分子の発現が認められなかったと考えられる。FGF および FGF をリガンドとする FGFR を起点とするシグナル経路は血管新生等に関与することが報告されており、FGFR の tyrosine kinase inhibitor (FGFR-TKI)の開発も進んでいる(Turner and Grose, 2010)。しかし、**Table 6-6** に示す通り、今回解析を行った 6 検体の GBM xenograft line では FGF をリガンドとする FGFR1~4 の発現がいずれも認められなかったことから、FGF/FGFR シグナルの寄与は小さいと考えられる。

第4章の結果から、GBM xenograft line plasma membrane fraction において増殖因子受容体関連の膜タンパク質として EGFR, PDGFR α , PDGFR β , ERBB2 の発現が認められた(**Table 4-2**)。Receptor Set を用いた増殖因子受容体関連分子の発現解析の結果、前述した 4 分子に加え MET, IGFR, RET, FAK1 の発現が GBM xenograft line において認められ(**Table 6-6**)、これらの分子に関しても分子標的療法のターゲット候補分子となる可能性がある。また、第4章でも述べたが erlotinib を含む EGFR-TKI に対する耐性には MET の過剰発現やリン酸化、そして MET のリガンドである HGF の過剰発現、さらに IGFR を介した増殖シグナルの亢進などが認められることが報告されている(Nguyen *et al.*, 2009, Rosenzweig, 2012)。

これはMETおよびIGFRがEGFRと共通の下流シグナル経路(PI3K/Akt経路およびMAPK経路)を有していることで、EGFRをのみを阻害したとしてもMETまたはIGFRを起点とするシグナルの存在のためにこれら下流シグナル経路が阻害しきれていないことが理由として考えられる。しかし、Table 6-6に示す通り、解析を行ったGBM xenograft line間でのMETおよびIGFRの発現量に大きな個人差は認められず、EGFR-TKIであるerlotinib耐性検体であるMayoGBM6, MayoGBM8, MayoGBM10で高発現しているという結果とはなっていない。従って、これら検体におけるerlotinib耐性に対するMETおよびIGFRの寄与は低いと考えられる。一方で、RETの発現はMayoGBM6およびMayoGBM8においてのみ認められており、これらの検体はともにerlotinib耐性の検体である。RETは甲状腺乳頭癌で発現が認められる受容体型チロシンキナーゼであり、GDNF, NRTN, ARTNをリガンドとすることが報告されている(Phay and Shah, 2010)。RET発現がerlotinib耐性に関与しているという報告はされていないが、RETもMETおよびIGFRと同様に下流シグナル経路としてPI3K/Akt経路およびMAPK経路を有している(Phay and Shah, 2010)。従って、METおよびIGFRと同様のメカニズムでRETがMayoGBM6およびMayoGBM8のEGFR-TKI耐性に関与する可能性がある。特に、第4章の結果でEGFRおよびEGFRvIII発現のみではerlotinib感受性を説明できなかったMayoGBM6に関しては第5章の結果からEGFR全体の発現に対するEGFR自己リン酸化体発現割合で説明が可能であることが示唆されたが、RET発現の観点からも説明が可能であると考えられる。MayoGBM6は第4章Table 4-1に示す全ての抗癌剤に対して耐性であり、第4章の結果からPDGFR α に対する分子標的薬であるsunitinibおよびsorafenibがMayoGBM6に対して有効である可能性がある。これに加え、本章の結果からMayoGBM6に対する分子標的療法のターゲット候補分子としてRETが挙げられる。VEGFRおよびEGFRのtyrosine kinase inhibitorであるvandetanibはRETに対しても阻害作用を

有していることが報告されており、RET 発現細胞株およびマウスを用いた実験で vandetanib は腫瘍増殖を抑制することが報告されている(Carlomagno *et al.*, 2002, Santoro *et al.*, 2004)。従って、MayoGBM6 に対しては sunitinib および sorafenib に加え vandetanib も有効である可能性がある。

Signal Set を用いた細胞内シグナル伝達関連分子の発現解析の結果、PI3K/AKT 経路および MAPK 経路のそれぞれで複数分子の発現が認められた(**Table 6-7**)。さらに、発現している分子の中でも PI3K/AKT 経路分子と比較して MAPK 経路分子で発現量が高い傾向が認められた。従って、発現量に基づいて考察した場合、GBM xenograft line における増殖因子受容体の細胞内シグナル経路は PI3K/AKT 経路と比較して MAPK 経路が亢進している可能性がある。しかし、これら細胞内シグナル伝達の実体は各分子のリン酸化等であり(Levitzki and Klein, 2010)、高発現していても必ずしも主なシグナル経路であるとは言えない。また、その他の経路で主に発現が認められた分子としては STAT1, STAT3, HSP90 α , SRC, FYN などが挙げられる(**Table 6-7**)。特に、HSP90 α はその他の分子と比較して非常に高発現していることが認められた。HSP90 α は細胞内タンパク質の 1~2%を占め、細胞質に最も多く存在するタンパク質の一つであることが知られており、本発現解析結果はそのことを反映している結果であると考えられる。HSP90 α は EGFR や ERBB2, AKT 等多くのタンパク質の正確なフォールディングや活性化状態の維持など腫瘍細胞の増殖浸潤に関わっていると考えられている(Whitesell and Lindquist, 2005)。HSP90 α 阻害剤である geldanamycin は正常細胞に発現する HSP90 α と比較して腫瘍細胞に発現する HSP90 α に対して高い親和性を有することが報告されていることから(Kamal *et al.*, 2003)、GBM xenograft において HSP90 α は分子標的療法の標的となり得る可能性がある。**Table 6-7** に示す通り、今回の発現解析結果から様々な細胞内シグナル伝達関連分子の発現が認められたが、各検体間における各分子の大きな発現量差は認められなかった。

第3章(ヒト悪性脳腫瘍組織)や第4章(GBM xenograft line)の結果から、増殖因子受容体発現量の個人差は非常に大きいことが示唆されていることから、タンパク質発現量に基づいて考えた場合、腫瘍増殖シグナルの起点となっている増殖因子受容体の発現が分子標的薬感受性の個人差を考えるうえで重要であると考えられる。

以上、第6章の結論として、GBM xenograft における分子標的薬感受性関連分子の一斉定量を行った結果、細胞内シグナル伝達関連分子の発現量と比較して増殖因子受容体発現量の個人差が大きいことが示唆された。また、分子標的療法を行う際のターゲット候補となる新たな増殖因子受容体の発現が認められ、分子標的薬選択の幅が拡大できることが示唆された。さらに、第5章においてEGFR 自己リン酸化体発現割合でerlotinib 感受性の説明が可能であることが示唆された MayoGBM6 に関して、RET 発現の観点からも説明できる可能性が見出された。

第7章 結論および展望

本研究では、悪性腫瘍における抗癌剤感受性変動の要因を明らかにすることを目指して、(i) *in vitro* 系培養細胞株における薬剤感受性変動に関与するトランスポーターの同定、(ii) ヒト悪性脳腫瘍組織検体における膜タンパク質発現プロファイルの解明および個別化分子標的療法のターゲット候補となり得る分子の同定、(iii) 悪性脳腫瘍 *xenograft line* における抗癌剤感受性変動に関与する膜タンパク質の同定、(iv) 悪性脳腫瘍 *xenograft line* における erlotinib 感受性に対する EGFR 自己リン酸化体発現量の関与の解明、(v) 悪性脳腫瘍 *xenograft line* における分子標的薬感受性関連分子発現プロファイルの解明を行った。

第2章では、胃癌細胞株においては etoposide 感受性変動に MRP1 発現量が、乳癌細胞株においては MTX 感受性変動に RFC1 および FPGS がそれぞれ関与していることが示唆された。また、詳細なメカニズムに関しては未だ不明ではあるが GLUT1 や 4F2hc の発現量に関しても薬剤感受性変動に関与する可能性があると考えられた。このように、定量的標的プロテオミクスを用いることで、多数の薬剤感受性候補分子の中から実際に薬剤感受性の変動に主な関与を示す分子を同定することが可能であることが示唆され、本手法が本研究の目的を達成するために有用であることが認められた。

個別化分子標的療法の臨床応用を目指すにあたり、実際の臨床組織検体における膜タンパク質の発現情報を得ることは避けては通れない。そこで、第3章では、ヒト悪性脳腫瘍組織検体における複数膜タンパク質の同時絶対定量を行うことで、膜タンパク質の発現プロファイルを明らかにした。その結果、複数の増殖因子受容体が悪性脳腫瘍における分子標的治療のターゲット候補分子となり得ることが認められた。特に、EGFR に関しては悪性脳腫瘍組織検体において高頻度で発現が認められ、さらにその発現量の個人差が非常に大きいことが

認められた。また、トランスポータータンパク質の細胞膜上での発現量に関しても個人差が存在することも認められた。従って、これらの膜タンパク質発現の個人差が薬剤感受性変動の要因となっていると考えられ、悪性脳腫瘍に対する個別化治療の必要性が示唆された。また、MCT1 や MCT4, JAM-A などが悪性脳腫瘍の浸潤能に関与している可能性があり、これらのタンパク質が新しい創薬ターゲット候補となる可能性がある。これらの知見は定量的標的プロテオミクスの手法に基づく悪性脳腫瘍における複数膜タンパク質の同時絶対定量が悪性脳腫瘍の今後の効果的な治療法の確立に新たな可能性を切り開くと考えている。また、実際に本定量解析の結果 PDGFR β が高発現している患者に対し PDGFR β を標的とする sunitinib を投与したところ腫瘍の縮小が認められたことから、本手法の臨床応用への可能性が示された。

In vivo 組織を用いて膜タンパク質発現量が薬剤感受性変動の要因となるかを明らかにするため、第 4 章ではヒト GBM 組織検体から作製した GBM xenograft line を用いた解析を行った。その結果、EGFRvIII の発現割合が高く PTEN 発現が認められる検体では EGFR に対する分子標的薬である erlotinib に対する感受性が高くなることが認められ、EGFRvIII の発現割合が erlotinib 感受性変動の原因の一つであることが示唆された。また、GBM に対する標準治療薬に対して耐性である MayoGBM6 のケースに示す通り、GBM xenograft line における複数の膜タンパク質の発現解析を行うことで第二第三の治療方針を行うための分子標的療法のターゲット候補分子を複数選択することが可能であることが認められた。

しかし、一方で EGFRvIII の発現割合のみでは erlotinib 感受性を説明できない検体も一部認められたことから、EGFRvIII 発現以外の因子が erlotinib 感受性に関与していることが示唆された。従って、第 5 章では EGFR の自己リン酸化に着目をし、複数の EGFR 自己リン酸化体を LC-MS/MS を用いて直接同時に絶対

定量する手法を確立し、GBM xenograft line における erlotinib 感受性の変動に EGFR 自己リン酸化体発現量が関与しているかを解析した。EGFR の自己リン酸化部位である EGFRpY1172 および EGFRpY1197 に関して直接絶対定量する手法を確立し、*in vivo* 組織である GBM xenograft line において EGFR 自己リン酸化体の発現を検出することが可能であることが示された。また、第 4 章で EGFR および EGFRvIII 発現量のみでは一部説明ができなかった erlotinib 感受性についても、EGFR 全体の発現に対する EGFR 自己リン酸化体発現割合によって説明が可能となることが示唆された。

第 5 章までは膜タンパク質を主な解析対象として研究を行っていたが、増殖因子受容体を起点とする腫瘍増殖シグナルには増殖因子受容体に加え受容体リガンドおよび細胞内シグナル伝達関連分子の発現に関しても考慮に入れる必要があると考えられた。従って、第 6 章では安定同位元素標識タンパク質を内標準物質として使用し、GBM xenograft における分子標的薬感受性関連分子の一斉定量を行った。その結果、細胞内シグナル伝達関連分子の発現量と比較して増殖因子受容体発現量の個人差が大きいことが示唆された。また、分子標的療法を行う際のターゲット候補となる新たな増殖因子受容体の発現が認められ、分子標的薬選択の幅が拡大できることが示唆された。また、第 5 章において EGFR 自己リン酸化体発現割合で erlotinib 感受性の説明が可能であることが示唆された MayoGBM6 に関して、RET 発現の観点からも感受性を説明できる可能性が見出された。

このように、本研究は悪性腫瘍における抗癌剤感受性変動の要因となり得る分子を複数同定した点、ヒト臨床組織検体における膜タンパク質発現プロファイルを明らかにすることで分子標的療法のターゲット候補分子を同定することが可能になった点で意義が大きく、悪性腫瘍に対する個別化治療の実現に向けた研究に大きな発展をもたらす成果であると考えられる。

第 8 章 試薬および実験方法

第 1 節 試薬

放射活性体および阻害剤

[3', 5', 7-³H]methotrexate disodium salt
MK571

Moravek Biochemicals Inc., CA, USA
Alexis Biochemicals, CA, USA

MTX ポリグルタミル化体

以下に示す MTX ポリグルタミル化体は全て Schircks Laboratories (Jona, Switzerland) から購入した。

MTX-Glu₂ (4-amino-10-methylpteroyl-di-γ-L-glutamic acid ammonium salt)
MTX-Glu₃ (4-amino-10-methylpteroyl-tri-γ-L-glutamic acid ammonium salt)
MTX-Glu₄ (4-amino-10-methylpteroyl-tetra-γ-L-glutamic acid ammonium salt)
MTX-Glu₅ (4-amino-10-methylpteroyl-penta-γ-L-glutamic acid ammonium salt)
MTX-Glu₆ (4-amino-10-methylpteroyl-hexa-γ-L-glutamic acid ammonium salt)
MTX-Glu₇ (4-amino-10-methylpteroyl-hepta-γ-L-glutamic acid ammonium salt)

細胞培養関連試薬

RPMI1640 medium
Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)
Fetal bovine serum (FBS)
0.25% Trypsin-EDTA
EGF Recombinant Human Protein

Invitrogen, Washington DC, USA
Nissui Pharmaceutical, Tokyo, Japan
Moregate, Bulimba, Australia
Gibco, invitrogen cell culture, Tokyo, Japan
Life Technologies, CA, USA

遺伝子関連試薬

GENECLEAN II KIT
TAKARA Ex Taq
DNA ligation kit <Mighty mix>
Quantum Prep Plasmid Miniprep kit
BamHI
EcoRI
Competent high *E. coli* DH5α

BIO101, CA, USA
Takara, Shiga, Japan
Takara, Shiga, Japan
Bio-Rad, CA, USA
Takara bio inc., Shiga, Japan
Takara bio inc., Shiga, Japan
TOYOBOKO CO, Osaka, Japan

タンパク質関連試薬

無細胞くん Quick
無細胞くん SI
安定同位元素標識アミノ酸水溶液 Lys, Arg-¹³C, ¹⁵N
HisPurTM Cobalt Spin Columns, 1 mL
Strep-Tactin[®] Sepharose[®] Column
Coomassie Brilliant Blue R-250 (CBB R-250)
DC-protein assay
Protease inhibitor cocktail
Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)
Lysyl endoproteidase
Sequencing Grade modified trypsin
PhosSTOP

TAIYO NIPPON SANSO, Tokyo, Japan
TAIYO NIPPON SANSO, Tokyo, Japan
TAIYO NIPPON SANSO, Tokyo, Japan
Thermo, Fisher Scientific, IL, USA
IBA, Germany
Bio-Rad, CA, USA
Bio-Rad, CA, USA
Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA
Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA
Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan
Promega Corporation, WI, USA
Roche Applied Science, Basel, Switzerland

抗体

Rabbit polyclonal anti EGFR antibody (ab2430)
abcam, Cambridge, UK

Rabbit polyclonal anti EGFR (phospho Y1172) antibody (ab47364)	abcam, Cambridge, UK
Rabbit polyclonal anti EGFR (phospho Y1197) antibody (ab47394)	abcam, Cambridge, UK
Mouse monoclonal anti β -actin antibody, Clone AC-74 (A2228)	SIGMA-Aldrich, MO, USA
HRP 標識 Anti rabbit IgG	KPL, Washington D.C., USA
HRP 標識 Anti mouse IgG	Chemicon, Temecula, CA, USA
ECL Prime	GE Healthcare, Uppsala, Sweden

定量用ペプチドプローブ

LC-MS/MS による膜タンパク質および酵素タンパク質絶対定量に用いたペプチド標品および対応する安定同位元素標識内標準ペプチドは Thermo-electron Corporation (Sedanstrabe, Germany)から購入した。

その他の試薬

LC-MS/MS の移動相には LC-MS グレードの acetonitrile (Wako pure chemical industries, Osaka, Japan)を用いた。その他の試薬は特に記載が無い限り、いずれも市販の特級品を用いた。

第2節 細胞培養およびサンプル調製

癌細胞パネルに含まれる細胞株の培養

癌細胞パネルに含まれる胃癌細胞株および乳癌細胞株は公益財団法人がん研究会がん化学療法センター分子薬理部の矢守隆夫氏から提供を受けた。これらの細胞株は加湿された 5% CO₂/air 下、37°C で培養した。培地には 5% fetal bovine serum, 70 μ g/mL benzylpenicillin potassium, 100 μ g/mL streptomycin sulfate, 24 mM NaHCO₃ を含む RPMI1640 medium を用いた。培養容器として tissue culture 10 mm dish (Becton Dickinson, Lincoln, Park, NJ)を用い、細胞の継代は 80-90%コンフルエントに達した時に 0.25% trypsin-EDTA を用いて細胞を回収し、4-6 倍に希釈して新しい培養容器に播種することで行った。細胞を長期間保存する場合はセルバンカー(Nippon Zenyaku Kogyo Co., Fukushima, Japan)に懸濁して-80°C 下で凍結した後、液体窒素内で保存した。

癌パネル細胞株に含まれる細胞株からの crude membrane fraction の調製

第2章で使用した癌細胞パネルに含まれる胃癌細胞株および乳癌細胞株の培養懸濁液から遠心操作 (120 g, 5 min, 4°C)によって細胞を回収した。これを 2 mL の ice-cold suspension buffer (250 mM sucrose, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4)および 20 μ L の protease inhibitor cocktail に懸濁し、窒素ガス細胞粉砕器を用いた nitrogen cavitation 法 (450 psi, 15 min, 4°C)によって細胞を破砕した。細胞破砕液を回収して protease inhibitor cocktail を 45 μ L 添加し、細胞破砕液を遠心 (10,000 g, 10 min, 4°C)することで debris 画分を取り除き、上清を回収した。回収した上清は超遠心(100,000 g, 60 min, 4°C)を行い、得られたペレットを crude membrane fraction とした。この crude membrane fraction は ice-cold suspension buffer に懸濁した。

組織検体からの plasma membrane fraction の調製

第3章で使用した **Table 3-1** に示す脳腫瘍検体および非腫瘍脳組織については金沢大学大学院医学系研究科 脳・脊髄機能制御学 濱田潤一郎 教授および中田光俊 講師から提供を受けた。また、非腫瘍脳組織のうち ABS111174161, ABS352JK00909, ABS2467970101 の3検体については Analytical Biological Services Inc. (Wilmington, DE, USA)から購入した。なお、本研究にあたっては東北大学大学院薬学研究科および金沢

大学大学院医学系研究科の倫理委員会の承認を受けた。第 4~6 章で使用した **Table 4-1** に示す GBM xenograft line については米国 Mayo Clinic, Department of Radiation Oncology の Jann N. Sarkaria, M.D. から提供を受けた。なお、本研究にあたっては東北大学大学院薬学研究科および米国 Mayo Clinic の倫理委員会の承認を受けた。

凍結保存された検体をミンスし、1/100 量の PMSF および protease inhibitor cocktail を含む ice-cold hypotonic buffer (10 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4) を加えた。テフロン製ホモジナイザーを用いて 10 ストロークした後に 30 分間氷中で静置し、さらに 20 ストロークして得られた破碎組織懸濁液を whole tissue lysate とした。顕微鏡で組織の状態を観察して細胞が十分に破碎されていない場合には、破碎組織懸濁液を窒素ガス細胞粉碎器に移し nitrogen cavitation 法 (450 psi, 15 min, 4°C) によって細胞を破碎した。この破碎組織懸濁液を遠心 (10,000 g, 10 min, 4°C) することで debris 画分を取り除き、上清を回収した。回収した上清は超遠心 (100,000 g, 40 min, 4°C) を行い得られたペレットを ice-cold suspension buffer で懸濁した。この懸濁液を 38% sucrose (10 mM Tris-HCl, pH 7.4) の上に重層して超遠心 (100,000 g, 40 min, 4°C) し、中間層を回収した。これを再度超遠心 (100,000 g, 40 min, 4°C) し、得られたペレットを plasma membrane fraction とした。この plasma membrane fraction は ice-cold suspension buffer に懸濁した。なお、第 5 章でリン酸化 EGFR 発現解析に用いた plasma membrane fraction を調製した際は全ての実験過程で phosphatase inhibitor である PhosSTOP を付属プロトコルの推奨濃度 (1 錠/10 mL) となるように添加したバッファを使用して調製を行った。

第 3 節 LC-MS/MS によるタンパク質絶対定量法 定量ペプチドプローブの設計

定量対象とするタンパク質のアミノ酸配列情報は ExPasy Proteomic Server (<http://au.expasy.org/>) の Swiss-prot/TrEMBL (UniProt) データベースから入手した。Trypsin 消化して得られると考えられるペプチド配列に対して、当研究室で確立したペプチドプローブ選択クライテリアを満たす配列 (以下の 1~8 の条件を必ず満たし、かつ 9~10 の条件をより多く満たす配列) を定量ペプチドプローブとして選択した (Kamiie *et al.*, 2008, Ohtsuki *et al.*, 2011, Uchida *et al.*, 2013)。

1. 対象とするタンパク質に特異的な配列であること
2. Methionine および cysteine を含まないこと
3. Trypsin 消化アミノ酸 (lysine, arginine) が連続していないこと
4. トリプシン消化部位の次のアミノ酸が proline ではないこと
5. アミノ酸残基数が 6~16 残基であること (8~10 残基が望ましい)
6. 膜貫通部位ではないこと
7. N 型糖鎖修飾を受ける配列を含まないこと
8. 修飾・変異・SNPs が報告されていないこと
9. Histidine を含まないこと (質量分析装置でのペプチド感度低下)
10. Proline または glycine を含むこと (質量分析装置でのペプチド感度増加)

選択した定量ペプチド配列について、ペプチド標品および対応する安定同位元素標識アミノ酸 (¹³C, ¹⁵N) を含む内標準ペプチドを合成した。これら合成ペプチドは Milli-Q 水に溶解した後、アミノ酸分析法 (日立高速液体クロマトグラフ LaChrom Elite: アミノ酸 (NIN 法) 分析システム, 日立ハイテック, Tokyo, Japan) によって濃度を決定した。ペプチド溶液を約 0.1 μM (50% acetonitrile, 0.1% formic acid) に調製し、5 μL/min で質量分析装置にインフュージョンして SRM/MRM 測定条件の最適化を行った。ESI によるイオン化は全

て positive mode とし、SRM/MRM transition は y ion または b ion 系列から 4 つ選択し、DP および CE はピーク強度が最大になる値を選択した。

還元アルキル化および酵素消化

Plasma membrane fraction および crude membrane fraction は DC protein assay kit を用いてタンパク定量を行った。タンパク質懸濁液と等容積以上の alkylation buffer (7 M guanidine hydrochloride, 10 mM EDTA-Na, 0.5 M Tris-HCl, pH 8.5) を添加して計 220 μ L とした。ここにタンパク質量と等量の dithiothreitol を添加し、1 時間攪拌した。その後、さらにタンパク質量の 2.5 倍量の iodoacetamide を添加し、遮光下で 1 時間攪拌した。これに ice-cold methanol 600 μ L、ice-cold chloroform 150 μ L、ice-cold Milli-Q 水 450 μ L を順に添加し、swing-rotor を用いて遠心 (12,000 rpm, 3 min, 4°C) した。上清を除いた後に ice-cold methanol 450 μ L をさらに添加し、もう一度遠心 (15,000 rpm, 5 min, 4°C) した。上清を完全に除いてタンパク質試料を回収した (methanol-chloroform 沈殿)。Methanol-chloroform 沈殿によって得られたタンパク質試料を 6 M urea (0.1 M Tris-HCl, pH 8.5) に溶解し、最終濃度 1.2 M urea となるように 0.1 M Tris-HCl (pH 8.5) を添加した。さらに、最終濃度 0.05% proteaseMAX となるように 1% proteaseMAX (Promega, Madison, WI, USA) を添加した。ここに含まれるタンパク質量の 1/100 量の lysyl endopeptidase を添加し、室温で 3 時間処理した。この処理後に、タンパク質量の 1/100 量の trypsin を添加し、37°C で 16 時間処理した。

Hydroxy Acid-Modified Metal Oxide Chromatography (HAMMOC 法)

リン酸化ペプチド精製濃縮には Titansphere™ Phos-TiO Kit (GL Sciences, Tokyo, Japan) を使用し、添付のプロトコルに従って行った。チタニアビーズ (粒径/充填剤量: 10 μ m/100 mg) が充填されたシリンジバレル型カラムに、Buffer A (80% acetonitrile, 0.5% TFA / Milli-Q water) を 200 μ L 加え、遠心した (500 g, 15°C, 2 min)。次に、Buffer B (300 mg/mL DL-Lactic acid / Buffer A) を 200 μ L 加えて遠心し (500 g, 15°C, 2 min)、平衡化を行った。Formic acid を 1% となるように添加した後に遠心 (15,000 rpm, 4°C, 5 min) した酵素消化溶液の上清と、2000 μ L の Buffer B をカラムに加えてピペッティング後、遠心 (500 g, 15°C, 5 min) してリン酸化ペプチドの吸着を行った。また、溶出液は再度カラムに加えてピペッティングを行った後に遠心し (500 g, 15°C, 5 min)、さらに同様の操作を再度行った。その後、Buffer B 200 μ L を加えて遠心 (500 g, 15°C, 2 min)、次いで Buffer A 200 μ L を加えて遠心 (500 g, 15°C, 2 min) という操作を 2 回繰り返すことによりカラムを洗浄した。次に、5% アンモニア水溶液 200 μ L を加えて遠心 (500 g, 15°C, 5 min)、5% ピロリジン水溶液 200 μ L を加えて遠心 (500 g, 15°C, 5 min) することで、リン酸化ペプチド精製濃縮溶液を得た。リン酸化ペプチド精製濃縮溶液は、脱塩処理を行う前に 20% TFA/Milli-Q を等容積添加することで酸性にした。

脱塩処理

GL-SDB tip (GL Sciences) および GL-GC tip (GL Sciences) に 0.1% TFA/80% acetonitrile を 50 μ L 加えて遠心し (3,000 g, 10°C, 2 min)、次いで 0.1% TFA/Milli-Q を 50 μ L 加えて遠心し (3,000 g, 10°C, 2 min)、チップカラム内における樹脂の平衡化を行った。次に、チップカラムにペプチド試料を添加して遠心し (3,000 g, 10°C, 5 min)、さらに 0.1% TFA/Milli-Q をペプチド試料の入っていたチューブに 50 μ L 加えてピペッティング後、カラムに添加して遠心した (3,000 g, 15°C, 2 min)。続いて、0.1% TFA/80% acetonitrile を 50 μ L 加えて遠心 (3,000 g, 10°C, 2 min) する操作を合計 2 回繰り返すことにより、合計 100 μ L のペプチド溶出液を得た。このペプチド溶液は、減圧遠心により溶媒を除去し、0.1% formic acid/Milli-Q に再溶解させることで脱塩済みペプチド溶液とした。

絶対発現量解析

Trypsin 消化したペプチド試料に一定量の安定同位元素標識内標準ペプチド混合溶液を添加し、最終濃度 1% となるように formic acid を添加した後に遠心(15,000 rpm, 15 min, 4°C)をし、その上清を LC-MS/MS にアプライした。絶対発現量解析においてはペプチド標品と安定同位元素標識内標準ペプチドのピーク面積比から検量線を作成した。測定サンプルにおいてペプチドのピークを同定し、各 SRM/MRM transition においてピーク面積比を求め、検量線から絶対定量値を算出した。

統計解析

各発現量は、平均値±標準誤差(mean±S.E.M.)で示した。統計的有意差の検定には、二群間では Student's unpaired t 検定を、三群間以上では分散分析(ANOVA)を用いて行った。

<LC-MS/MS 測定条件>

◆ nanoLC-MS/MS (4000QTRAP)を用いた場合

nano-LC: nano-LC system (LC-assist, Tokyo, Japan)

MS/MS: ESI-triple quadrupole mass spectrometer (4000QTRAP; AB SCIEX, Foster City, USA)

Column: direct nano flow spray tip reversed phase column (150 µm inner diameter x 50 mm) of Mightysil-C18 (125 Å, 3 µm particles; Kanto Chemicals, Tokyo, Japan) connected in tandem through an automated solvent desalting device and nano ion source (nanospray; AB SCIEX, Foster City, USA)

Mobile Phase: (A) 0.1% formic acid/Milli-Q (B) 0.1% formic acid/acetonitrile

Flow rate: 100 nL/min

Gradient: 1% B (0-5 min), 1-35% B (5-35 min), 70% B (36-56 min), 1% B (56-91 min)

◆ HPLC-MS/MS (API5000)を用いた場合

HPLC: Agilent 1200 HPLC system (Agilent technologies, Santa Clara, USA)

MS/MS: ESI-triple quadrupole mass spectrometer (API5000; AB SCIEX, Foster City, USA)

Column: ZORBAX SB-C18, 80 Å, 5 µm, 150 x 0.5 mm (Agilent technologies, Santa Clara, USA)

Mobile Phase: (A) 0.1% formic acid/Milli-Q (B) 0.1% formic acid/acetonitrile

Flow rate: 50 µL/min

Gradient: 1% B (0-5 min), 1-45% B (5-65 min), 100% B (66-67 min), 1% B (68-120 min)

◆ HPLC-MS/MS (QTRAP5500)を用いた場合

HPLC: Agilent 1200 HPLC system (Agilent technologies, Santa Clara, USA)

MS/MS: ESI-triple quadrupole mass spectrometer (QTRAP5500; AB SCIEX, Foster City, USA)

Column: XBridge BEH130 C18, 130 Å, 3.5 µm, 100 x 1.0 mm (Waters)

Mobile Phase: (A) 0.1% formic acid/Milli-Q (B) 0.1% formic acid/acetonitrile

Flow rate: 50 µL/min (0-130 min)

Gradient: 1% B (0-5 min), 1-60% B (5-65 min), 100% B (66-68 min), 1% B (70-130 min)

◆ EGFR リン酸化体測定時

HPLC: Agilent 1200 HPLC system (Agilent technologies, Santa Clara, USA)

MS/MS: ESI-triple quadrupole mass spectrometer (QTRAP5500; AB SCIEX, Foster City, USA)

Column: XBridge BEH130 C18, 130 Å, 3.5 µm, 100 x 1.0 mm (Waters)

Mobile Phase: (A) 0.1% formic acid/Milli-Q (B) 0.1% formic acid/acetonitrile

Flow rate: 50 μ L/min (0-210 min)

Gradient: 1% B (0-5 min), 1-70% B (5-145 min), 100% B (146-148 min), 1% B (150-210 min)

Data analysis: Analyst software 1.5 または Analyst software 1.4.2 (AB SCIEX, Foster City, USA)、MRM Quantitation System (三井情報株式会社)を用いて解析した。

第4節 細胞増殖阻害実験

胃癌細胞株(St-4, MKN45, MKN1)に対する細胞増殖阻害実験

2 継代目の細胞を回収し、細胞計数を行って 5×10^3 cells/100 μ L になるよう培地交換、再懸濁し、各 well あたり 100 μ L ずつ 96 well plate に播種した。24 時間前培養した後、ここに 7 点 (0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30, 100 μ M) からなる etoposide の希釈系列を、各濃度最終液量が 200 μ L となるように添加し、加湿された 5% CO₂/air 下、37°C で 72 時間培養した。Cell-counting kit-8 (DOUJINDO, Kumamoto, Japan) を各 well あたり 10 μ L ずつ添加し攪拌した後、加湿された 5% CO₂/air 下、37°C で 4 時間インキュベートした。各 well の 450 nm における吸光度を測定し、0.1% の DMSO が含まれる培地 200 μ L の吸光度との差から細胞数を評価した。Etoposide を含まない点を 100% とした時の各 etoposide 濃度における細胞生存率を算出し、50% 生存となる濃度を etoposide に対する IC₅₀ とした。阻害剤 (50 μ M MK571) を用いる場合は、24 時間の前培養の後に阻害剤を加え、さらに 1 時間プレインキュベートしてから同濃度の阻害剤を含む etoposide 希釈系列溶液を添加した。

第5節 細胞内薬剤取り込み実験

乳癌細胞株(MCF-7, HBC-4, BSY-1, HBC-5, MDA-MB-231)に対する [³H]methotrexate 取り込み実験

2 継代目の細胞を回収し、細胞計数を行って 1×10^5 cells/500 μ L になるよう培地交換、再懸濁し、各 well あたり 500 μ L ずつ 24 well plate に播種した後に、コンフルエントに達するまで加湿された 5% CO₂/air 下、37°C で前培養した。

ホットプレート上でプレートの温度を 37°C に保ちながら培地を除去後、37°C の HEPES-ECF buffer (122 mM NaCl, 25 mM NaHCO₃, 10 mM D-glucose, 3 mM KCl, 1.4 mM CaCl₂, 1.2 mM MgSO₄·7H₂O, 0.4 mM K₂HPO₄, 10 mM HEPES, pH 7.4) 1 mL で 2 回洗浄し、37°C HEPES-ECF buffer (pH 7.4) を 200 μ L 添加して 37°C で 10 分間 pre-incubation を行った。HEPES-ECF buffer (pH 7.4) を除去し、[3', 5', 7-³H]methotrexate disodium salt (0.5 μ Ci/200 μ L; 90 nM) を含む 37°C HEPES-ECF uptake buffer (pH 7.4) 200 μ L を添加し、37°C ホットプレート上でインキュベートした。定常状態 (48 hr) での取り込みでは、uptake buffer として [3', 5', 7-³H]methotrexate disodium salt (0.5 μ Ci/1 mL; 18 nM) を含む RPMI1640 medium 1 mL を添加し、加湿された 5% CO₂/air 下、37°C で所定の時間インキュベートした。一定時間後 (3 min, 10 min, 30 min, 48 hr)、uptake buffer 2 μ L を培地中放射活性測定用としてシンチレーションバイアルに回収し、残りの uptake buffer を吸引除去した。直ちに 4°C の HEPES-ECF buffer (pH 7.4) 1 mL で 3 回洗浄し、細胞をプレート上で乾燥させ、200 μ L の 5 N NaOH を各 well に添加して 3 時間以上放置して細胞を可溶化した。ここに 200 μ L の 5 N HCl を各 well に添加して中和を行い、200 μ L をシンチレーションバイアルに採取した。シンチレーションバイアルに液体シンチレーションカクテル Hionic fluor (Packard, Meriden, CT) 4 mL を添加し、3 時間以上放置した後に、液体シンチレーションカウンタ (LS-6500, Beckman, Fullerton, CA) で細胞内および培地中の放射活性を測定した。また、細胞のタンパク質量は DC protein assay kit を用いて定量を行

った。得られた $[^3\text{H}]$ methotrexate の放射活性およびタンパク質量から、細胞内取り込み量を cell/medium ratio (C/M ratio)で表した。

C/M ratio ($\mu\text{L}/\text{mg protein}$) =

タンパク量あたりの細胞内 ^3H 放射活性 (dpm/mg protein)/培地中の ^3H 放射活性 (dpm/ μL)

乳癌細胞株(MCF-7, HBC-4, BSY-1, HBC-5, MDA-MB-231)に対する methotrexate ポリグルタミル化体細胞内蓄積量測定

2 継代目の細胞を回収し、細胞計数を行って 2×10^5 cells/1 mL になるよう培地交換、再懸濁し、各 well あたり 1 mL ずつ 12 well plate に播種した後に、コンフルエントに達するまで加湿された 5% CO_2/air 下、 37°C で前培養した。

ホットプレート上でプレートの温度を 37°C に保ちながら培地を除去後、 37°C の HEPES-ECF buffer (122 mM NaCl, 25 mM NaHCO_3 , 10 mM D-glucose, 3 mM KCl, 1.4 mM CaCl_2 , 1.2 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.4 mM K_2HPO_4 , 10 mM HEPES, pH 7.4) 1 mL で 2 回洗浄し 37°C RPMI1640 medium を添加して 37°C で 10 分間プレインキュベーションを行った。RPMI1640 medium を除去し、200 nM methotrexate を含む 37°C RPMI1640 medium 1 mL を添加し、加湿された 5% CO_2/air 下、 37°C でインキュベーションした。24 時間後、uptake buffer 10 μL を培地中 methotrexate ポリグルタミル化体濃度測定用として回収し、残りの uptake buffer を吸引除去した。直ちに 4°C の HEPES-ECF buffer (pH 7.4) 1 mL で 3 回洗浄し、細胞をプレート上で乾燥させ、539 μL の 0.2 N NaOH を各 well に添加した。さらに uptake サンプルには 50% acetonitrile 10.8 μL を、検量線用サンプルには 50% acetonitrile に溶解させた methotrexate ポリグルタミル化体混合溶液希釈系列 10.8 μL をそれぞれ添加して 4°C , over night で静置し細胞を可溶化させた。ここに 53.9 μL の 1 N HCl を各 well に添加して中和を行い、一部を細胞のタンパク質量測定用に分取した。懸濁液 450 μL に 0.1% formic acid/acetonitrile 450 μL および 100% formic acid 10 μL を添加して除タンパクを行い、遠心 (15,000 rpm, 5 min, 4°C)をし、上清 880 μL を回収した。回収した上清に対し減圧遠心濃縮を行うことで溶媒を完全に除去した。ここに 0.1% formic acid/Milli-Q 200 μL および 100% formic acid 2 μL を添加して溶解し、10 分間振盪混和した。混和後の溶液を遠心 (15,000 rpm, 5 min, 4°C)し、上清 50 μL を細胞中 methotrexate ポリグルタミル化体濃度測定用サンプルとして LC-MS/MS にアプライした。また、培地中 methotrexate ポリグルタミル化体濃度測定用に回収した uptake buffer 10 μL には HEPES-ECF buffer (pH 7.4) 390 μL を添加し、uptake サンプルには 50% acetonitrile 10 μL を、検量線用サンプルには 50% acetonitrile に溶解させた methotrexate ポリグルタミル化体混合溶液希釈系列 10 μL をそれぞれ添加した。さらに、100% formic acid 10 μL を添加し、遠心 (15,000 rpm, 5 min, 4°C)を行い、その上清 50 μL を培地中 methotrexate ポリグルタミル化体濃度測定用サンプルとして LC-MS/MS にアプライした。なお、細胞のタンパク質量は DC protein assay kit を用いて定量を行った。

<LC-MS/MS 測定条件>

HPLC: Agilent 1200 HPLC system (Agilent technologies, Santa Clara, USA)

MS/MS: ESI-triple quadrupole mass spectrometer (API5000; AB SCIEX, Foster City, USA)

Column: ZORBAX XDB-C18, 80 Å, 5 μm , 150 x 2.1 mm (Agilent)

Mobile Phase: (A) 0.1% formic acid/Milli-Q (B) 0.1% formic acid/acetonitrile

Flow rate: 200 $\mu\text{L}/\text{min}$

Gradient: 5% B (0-2 min), 5-100% B (2-17 min), 100-5% B (17-18 min), 5% B (18-30 min)

molecule	Q1	Q3	DP	CE
MTX	455.4	308.2	151	27
MTX-Glu2	584.6	308.2	156	37
MTX-Glu3	713.7	308.2	181	47
MTX-Glu4	842.8	308.2	150	51
MTX-Glu5	971.9	308.2	150	63
MTX-Glu6	1101.0	308.2	150	78
MTX-Glu7	1230.1	308.2	150	89

胃癌細胞株 (St-4, MKN45, MKN1)に対する etoposide 取り込み実験

2 継代目の細胞を回収し、細胞計数を行って 1×10^5 cells/500 μ L になるよう培地交換、再懸濁し、各 well あたり 500 μ L ずつ 24 well plate に播種した後に、コンフルエントに達するまで加湿された 5% CO₂/air 下、37°C で前培養した。

ホットプレート上でプレートの温度を 37°C に保ちながら培地を除去後、37°C の HEPES-ECF buffer (122 mM NaCl, 25 mM NaHCO₃, 10 mM D-glucose, 3 mM KCl, 1.4 mM CaCl₂, 1.2 mM MgSO₄·7H₂O, 0.4 mM K₂HPO₄, 10 mM HEPES, pH 7.4) 1 mL で 2 回洗浄し、50 μ M MK571 を含む 37°C RPMI1640 medium を添加して 37°C で 10 分間プレインキュベーションを行った。RPMI1640 medium を除去し、1 μ M etoposide および 50 μ M MK571 を含む 37°C RPMI1640 medium 1 mL を添加し、加湿された 5% CO₂/air 下、37°C でインキュベーションした。48 時間後、uptake buffer 10 μ L を培地中 etoposide 濃度測定用として回収し、残りの uptake buffer を吸引除去した。直ちに 4°C の HEPES-ECF buffer (pH 7.4) 1 mL で 3 回洗浄し、細胞をプレート上で乾燥させ、150 μ L の hypotonic buffer (10 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4) を各 well に添加した。さらに uptake サンプルには 50% acetonitrile 10 μ L を、検量線用サンプルには 50% acetonitrile に溶解させた etoposide 希釈系列 10 μ L をそれぞれ添加して 4°C、over night で静置した。超音波破碎を行った後に懸濁させ、一部を細胞のタンパク質量測定用に分取した。懸濁液 100 μ L に 0.1% formic acid/acetonitrile 100 μ L および 100% formic acid 5 μ L を添加して除タンパクを行い、遠心 (15,000 rpm, 5 min, 4°C) をし、上清 180 μ L を回収した。回収した上清に対し減圧遠心濃縮を行うことで溶媒を完全に除去した。ここに 0.1% formic acid/Milli-Q 200 μ L および 100% formic acid 2 μ L を添加して溶解し、10 分間振盪混和した。混和後の溶液を遠心 (15,000 rpm, 5 min, 4°C) し、上清 50 μ L を細胞中 etoposide 濃度測定用サンプルとして LC-MS/MS にアプライした。また、培地中 etoposide 濃度測定用に回収した uptake buffer 10 μ L には HEPES-ECF buffer (pH 7.4) 390 μ L を添加し、uptake サンプルには 50% acetonitrile 10 μ L を、検量線用サンプルには 50% acetonitrile に溶解させた etoposide 希釈系列 10 μ L をそれぞれ添加した。さらに、100% formic acid 10 μ L を添加し、遠心 (15,000 rpm, 5 min, 4°C) を行い、その上清 50 μ L を培地中 etoposide 濃度測定用サンプルとして LC-MS/MS にアプライした。なお、細胞のタンパク質量は DC protein assay kit を用いて定量を行った。

<LC-MS/MS 測定条件>

HPLC: Agilent 1200 HPLC system (Agilent technologies, Santa Clara, USA)

MS/MS: ESI-triple quadrupole mass spectrometer (API5000; AB SCIEX, Foster City, USA)

Column: ZORBAX XDB-C18, 80 Å, 5 μ m, 150 x 2.1 mm (Agilent)

Mobile Phase: (A) 0.1% formic acid/Milli-Q (B) 0.1% formic acid/acetonitrile

Flow rate: 200 μ L/min

Gradient: 5% B (0-2 min), 5-100% B (2-7 min), 100-5% B (7-8 min), 5% B (8-20 min)

Parameter (etoposide): Q1=589.2, Q3=229.2, DP=76 (V), CE=23 (V)

第6節 In-gel digestion 法によるタンパク質発現量解析

SDS-PAGE サンプル前処理

癌細胞パネルに含まれる乳癌細胞株(HBC-4 および HBC-5)の whole cell lysate を suspension buffer で懸濁し、そこに懸濁液の 1/2 量の 2x sample buffer (4% sodium dodecyl sulfate (SDS), 125 mM Tris-HCl (pH 6.8), 10% sucrose, 0.004% bromophenol blue)を添加した。この懸濁液を 37°C で 1 時間インキュベーションし、これを泳動サンプルとした。

SDS-PAGE

12% gel (Separation gel: 12% Acrylamide stock solution, 373 mM Tris-HCl (pH 8.8), 0.1% SDS, 0.08% N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine (TEMED), 0.08% Ammonium persulfate (APS), Stacking gel: 3% Acrylamide stock solution, 125 mM Tris-HCl (pH 6.8), 0.1% SDS, 0.08% TEMED, 0.08% APS)に泳動サンプルを loading し、泳動 buffer (25 mM Tris, 192 mM glycine, 0.1% SDS)中で stacking gel 中は 20 mA、separation gel 中は 40 mA で合計約 1 時間電気泳動を行い、タンパク質をサイズ別に分画した。

CBB 染色

泳動終了後、ゲルを CBB R-250 に浸し室温で 10 分間振盪を行うことでゲルの染色を行った後に、wash buffer (20% v/v methanol, 7% v/v acetic acid)中、室温で 16 時間振盪を行うことでゲルの脱色を行い、サイズ別に分画したタンパク質を可視化した。

目的バンド付近のゲルの切り出しおよびゲルの洗浄・脱色

バンドを可視化したゲル中の FPGS の分子量 (65 kDa)付近のゲル (50~75 kDa)を切り取り、さらに 1 mm 四方のブロックになるように切り刻み、低吸着 1.5 mL tubeに移した。ここに 50 mM NH_4HCO_3 /50% methanol 500 μL を添加し、室温で 15 分間振盪混和した後に溶媒を除いた。上記の操作を再度繰り返し、ゲルの洗浄および脱色を行った。次に、50 mM NH_4HCO_3 /50% acetonitrile 500 μL を添加して室温で 15 分間振盪混和した後に溶媒を除く操作を計 4 回行った。

還元アルキル化

溶媒を丁寧に取り除き 100% acetonitrile 100 μL を添加し、室温で 10 分間静置した。ゲルが脱水されて収縮した後に acetonitrile を除去し、10 mM dithiothreitol/6 M guanidine hydrochloride/50 mM NH_4HCO_3 を添加し、10 分程度静置してゲルが膨張したのを確認して室温で 1 時間攪拌することで還元を行った。溶媒を除いた後に 100% acetonitrile 300 μL を添加して室温で 15 分間静置し、acetonitrile を除き 15 分間静置することでゲル片を乾燥させた。ここに 50 mM iodoacetamide/6 M guanidine hydrochloride/50 mM NH_4HCO_3 を添加し、室温で 45 分間静置することでアルキル化を行った。

Dithiothreitol および iodoacetamide の除去

還元アルキル化終了後に溶媒を除き、10% acetic acid:100% methanol (1:1 v/v) 500 μL を添加して室温で 30 分間激しく攪拌し洗浄した。溶媒を除き上記操作をさらに 2 回繰り返し、50 mM NH_4HCO_3 300 μL を添加して室温で 15 分間振盪した。溶媒を除去後、100% acetonitrile 300 μL を添加して室温で 15 分間振盪し、10 分間減圧遠心濃縮を行うことでゲル片を完全に乾燥させた。

酵素消化

0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ trypsin 溶液 20 μL を添加し、ゲル片が膨張するまで静置した。ここで、ゲル量が多くゲル片の膨張が不十分な場合は trypsin 溶液を追加した。Trypsin 溶液がゲル片に吸収された後、ゲル片が完全に浸るまで最少量の 25 mM NH_4HCO_3 を添加し、37°C

で 16 時間インキュベートすることで酵素消化を行った。酵素消化後、ゲル片に acetonitrile/Milli-Q/formic acid (66:33:0.1 v/v) 40 μ L を添加し、超音波洗浄機を用いて 10 分間超音波処理を行った。スピンドウン後、この溶媒を新しい低吸着 tube に回収し酵素消化サンプルとした。さらに、ゲル片に acetonitrile/Milli-Q/formic acid (66:33:0.1 v/v) 40 μ L を添加し、超音波洗浄機を用いて 10 分間超音波処理を行い、スピンドウンして溶媒を上記低吸着 tube に回収した。ゲル片に 100% acetonitrile 40 μ L を添加して室温で 15 分間静置し、スピンドウンして溶媒を上記低吸着 tube に回収した。回収した酵素消化サンプルを減圧下で evaporation し、溶液量を 50 μ L 程度に濃縮した。

絶対定量解析

Trypsin 消化した peptide 試料に一定量の安定同位元素標識内標準ペプチド溶液を添加し、最終濃度 1% となるように formic acid を添加した後に遠心(15,000 rpm, 15 min, 4°C)をし、その上清を LC-MS/MS にアプライした。

第 7 節 Western blot 法

A431 細胞株に対する EGF 処理および SDS-PAGE サンプル前処理

ヒト上皮様細胞癌由来細胞株である A431 細胞株の 10% FBS を含む培地を除去して PBS(-) (137 mM NaCl, 8.10 mM Na₂HPO₄, 2.68 mM KCl, 1.47 mM KH₂PO₄)で 2 回洗浄した後、無血清培地を添加し、加湿された 5% CO₂/air の下、16 時間培養した。無血清培地を除去し、0.1 μ M の濃度となるように erlotinib を添加した無血清培地を細胞に加え、加湿された 5% CO₂/air の下、1 時間プレインキュベーションした。再度、培地を除去し、上記濃度の erlotinib 含有無血清培地に対して 100 ng/mL の濃度となるように EGF を添加した培地を細胞に加え、加湿された 5% CO₂/air の下、5 分間インキュベーションした。細胞の培地を取り除き、細胞表面を PBS (-)で 2 回洗浄した。さらに PBS (-) 2 mL を加え、セルスクレーパーを用いて細胞を回収し、遠心した(4°C, 230 g, 5 min)。遠心後、PBS (-)を除去し、2 mL の hypotonic buffer (10 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl, pH7.4)を加えて懸濁し、whole cell lysate とした。十分に懸濁した後、DC protein assay kit (Bio-Rad) を用いてタンパク質濃度を測定した。なお、hypotonic buffer には phosphatase inhibitor である PhosSTOP を付属プロトコルの推奨濃度(1 錠/10 mL)となるように添加した。この A431 細胞株 whole cell lysate に対し懸濁液の 1/2 量の 2x sample buffer (4% sodium dodecyl sulfate (SDS), 125 mM Tris-HCl (pH 6.8), 10% sucrose, 0.004% bromophenol blue)を添加した。この懸濁液を 95°C で 5 分間インキュベーションし、これを泳動サンプルとした。

SDS-PAGE

8% gel (Separation gel: 8% Acrylamide stock solution, 373 mM Tris-HCl (pH 8.8), 0.1% SDS, 0.08% N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine (TEMED), 0.08% Ammonium persulfate (APS), Stacking gel: 3% Acrylamide stock solution, 125 mM Tris-HCl (pH 6.8), 0.1% SDS, 0.08% TEMED, 0.08% APS)に泳動サンプルを loading し、泳動 buffer (25 mM Tris, 192 mM glycine, 0.1% SDS)中で stacking gel 中は 20 mA、separation gel 中は 40 mA で合計約 1 時間電気泳動を行い、タンパク質をサイズ別に分画した。

Western blotting

SDS-PAGE 終了後、ゲルを転写 buffer (25 mM trizma base, 192 mM glycine, 20% methanol) に 5 分間浸した後、wet blotting 方式で PVDF 膜に 100 V で 4 時間転写を行った。PVDF 膜をブロッキングバッファー(4% skim milk を含む 0.1% Tween20/PBS (0.1% Tween20, 50 mM NaF, 5 mM Na₃VO₄, 137 mM NaCl, 8.10 mM Na₂HPO₄, 2.68 mM KCl, 1.47

mM KH_2PO_4))に浸し、4°Cで一晩振とうしながらブロッキングを行った。1次抗体として、rabbit polyclonal 抗 EGFR 抗体 (1:200)、rabbit polyclonal 抗 EGFR (phosphor Y1172) 抗体 (1:500)、rabbit polyclonal 抗 EGFR (phosphor Y1197) 抗体 (1:500)、mouse monoclonal 抗 β -actin 抗体 (1:5000) をそれぞれ含むブロッキングバッファー中、4°Cで一晩振とうしながら反応させた(括弧内は希釈濃度)。ブロッキングバッファーで4回洗浄した後、2次抗体としてHRP標識抗rabbit IgG抗体 (1:5000)、HRP標識抗mouse IgG抗体 (1:5000) をそれぞれ含むブロッキングバッファー中で、室温で1時間振とうしながら反応させた(括弧内は希釈濃度)。2次抗体反応後、0.1% Tween20/PBSで4回洗浄した。これにECL Prime 溶液を5分間反応させ、ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare)で露光と検出を行った。

第8節 遺伝子実験

制限酵素 BamHI, EcoRI による cDNA の切断

10 μL の合成 cDNA または pET-17b vector に対して、1 μL の BamHI, 1 μL の EcoRI, 2 μL の NEB buffer 4 を加え、さらに Milli-Q を加えて 20 μL の反応系を作成して 37°C で3時間インキュベートした。この DNA 溶液に対し 1/10 液量の 10x Loading buffer (0.25% bromophenolblue, 0.25% xylene cyanol FF, 50% glycerol)を加え、agarose gel (1% agarose, 0.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ethidium bromide を含む TAE buffer (40 mM Tris, 40 mM acetic acid, 1 mM EDTA))に loading し、TAE buffer を泳動 buffer として Mupid21 ミニゲル泳動槽を用いて 100 V で 40 min 泳動を行った。Agarose gel から期待されたサイズ付近に検出されたバンドを UV 照射下で切り出し、GENECLEAN II KIT を用い、標準プロトコルに従って DNA 断片の精製を行った。

DNA 切断断片の pET-17b vector への ligation

制限酵素 BamHI, EcoRI を処理して得られた pET-17b vector および合成 cDNA の切断断片を混合し、得られた溶液に対して等量の 2x Ligation Mix を加え、16°C で30分間インキュベートすることにより、合成タンパク質作製に用いる plasmid DNA を得た。

大腸菌への形質転換

Plasmid DNA を大腸菌に導入して形質転換させるため、ligation 反応液を competent cell (competent high *E. Coli*. DH5 α (TOYOBO)) 100 μL に加えて攪拌後、氷上で30分間インキュベーションした。次に 42°C で30秒間ヒートショックを加えた後、直ちに氷上に戻すことで competent cell に plasmid DNA を組み込んだ。さらに SOC 培地 (DH5 α 付属品) を 900 μL 加え攪拌機で 37°C、1時間インキュベーションした後、LB/Amp plate ((150 mg/L Ampicillin, 10 g/L bacto tryptone, 5 g/L bacto yeast extract, 10 g/L NaCl, 15 g/L bacto agar) gel でコートされた 10 cm dish)に培養液を播き、37°C で16時間インキュベーションすることで competent cell のコロニーを形成させた。

Plasmid DNA の回収

形成されたコロニーの大腸菌を LB/Amp medium (50 mg/L Ampicillin, 10 g/L Bacto tryptone, 5 g/L Bacto yeast extract, 10 g/L NaCl)中で 37°C、18時間培養した。培養懸濁液を遠心し (3,000 g, 10 min, 4°C)、得られた沈殿物に対して Quantum Prep Plasmid Miniprep kit を用いてプラスミドを精製した。プラスミドの濃度測定は分光光度計(GeneQuant 1300 Spectrophotometer, GE Healthcare)を用いて測定した。目的の plasmid DNA が回収できているかを確認するため、制限酵素 BamHI, EcoRI による cDNA の切断と同様の方法で BamHI および EcoRI を用いた制限酵素処理を行い、agarose gel 電気泳動を行った。

第9節 安定同位元素標識タンパク質の合成

無細胞くん SI を用いた安定同位元素標識タンパク質合成

安定同位元素標識タンパク質の作製には、大腸菌の無細胞くん SI および無細胞くん用安定同位元素標識アミノ酸混合物水溶液-Lys, Arg- ^{13}C , ^{15}N を使用した。作製したプラスミド DNA 溶液と安定同位元素標識アミノ酸混合物水溶液を反応液に加えて 30°C で 16 時間インキュベーションした。反応液を分取して遠心(15,000 rpm, 5 min, 4°C) し、上清を soluble fraction、沈殿を insoluble fraction として回収した。各画分に氷上で Milli-Q 水 45 μL と ice-cold acetone 100 μL を加えて氷上で 10 分間静置し、遠心 (12,000 rpm, 5 min, 4°C) した後、上清を除去することでタンパク質を濃縮した。Insoluble fraction に関しては 7M urea, 50 mM trizma base, 300 mM sodium chloride, pH 8.0 を 100 μL 添加して可溶化した後に Triton X-100, 50 mM trizma base, 300 mM sodium chloride, pH 8.0 を 900 μL を添加して urea 濃度を低下させた後に、以降の精製操作を行った。

Strep-Tactin[®] Sepharose[®] column を用いた安定同位元素標識タンパク質の精製

精製用カラムとして Strep-Tactin[®] Sepharose[®] Column を用いた。カラムに Wash buffer (1% Triton X-100, 50 mM trizma base, 300 mM sodium chloride, pH 8.0) を 1 mL 添加し、次いで 2 mL を添加することで平衡化を行った。なお、カラムの通液は重力による自然落下にて行った。カラムに無細胞くん SI 反応液の insoluble fraction を可溶化させた安定同位元素標識タンパク質溶液を添加してカラムを通液させた。次に、カラムに Wash buffer (1% Triton X-100, 50 mM trizma base, 300 mM sodium chloride, pH 8.0) を 2 mL 添加し通液する操作を 3 回繰り返すことで洗浄を行った。そして、カラムに Elution buffer (7 M urea, 150 mM imidazole, 50 mM trizma base, 300 mM sodium chloride, pH 8.0) を 500 μL 添加し通液する操作を 6 回繰り返すことで安定同位元素標識タンパク質の溶出を行った。

Cobalt Column を用いた安定同位元素標識タンパク質の精製

精製用カラムとして HisPur[™] Cobalt Spin Columns, 1 mL volume を用いた。カラムに Wash buffer (7 M urea, 50 mM trizma base, 300 mM sodium chloride, pH 8.0) を 2 mL 添加し、遠心(700 g, 2 min, 4°C) する操作を 2 回繰り返すことで平衡化を行った。カラムに Strep-Tactin column を用いた精製済み安定同位元素標識タンパク質溶液を添加し、4°C で 30 分間転倒混和を行うことで吸着させ、遠心した(700 g, 2 min, 4°C)。次に、カラムに Wash buffer (7 M urea, 50 mM trizma base, 300 mM sodium chloride, pH 8.0) を 2 mL 添加し、遠心(700 g, 2 min, 4°C) する操作を 3 回繰り返すことで洗浄を行った。そして、カラムに Elution buffer (7 M urea, 150 mM imidazole, 50 mM trizma base, 300 mM sodium chloride, pH 8.0) を 2 mL 添加し、遠心 (700 g, 2 min, 4°C) する操作を 5 回繰り返すことで安定同位元素標識タンパク質の溶出を行った。

精製済み安定同位元素標識タンパク質の限外濾過

Spin Concentrator (4 mL, 5K MWCO, Agilent Technologies) に精製済み安定同位元素標識タンパク質溶液を加え、濃縮後の溶液が 300 μL 未満になるまで、1 時間以上かけて遠心を行った(7,500 g, 10°C)。濃縮後のサンプルに PBS(-) を添加して溶媒を 10 倍希釈し、再び遠心による濃縮を行った。再度、濃縮後のサンプルを PBS で 10 倍希釈し、遠心による濃縮を行った。

引用文献

- Abolhoda A, Wilson AE, Ross H, Danenberg PV, Burt M, Scotto KW (1999) Rapid activation of MDR1 gene expression in human metastatic sarcoma after in vivo exposure to doxorubicin. *Clin Cancer Res* 5:3352-3356.
- Agnihotri S, Burrell KE, Wolf A, Jalali S, Hawkins C, Rutka JT, Zadeh G (2013) Glioblastoma, a brief review of history, molecular genetics, animal models and novel therapeutic strategies. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 61:25-41.
- Andrae J, Gallini R, Betsholtz C (2008) Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes Dev* 22:1276-1312.
- Assaraf YG (2007) Molecular basis of antifolate resistance. *Cancer Metastasis Rev* 26:153-181.
- Bai RY, Staedtke V, Riggins GJ (2011) Molecular targeting of glioblastoma: Drug discovery and therapies. *Trends Mol Med* 17:301-312.
- Batra SK, Castellino-Prabhu S, Wikstrand CJ, Zhu X, Humphrey PA, Friedman HS, Bigner DD (1995) Epidermal growth factor ligand-independent, unregulated, cell-transforming potential of a naturally occurring human mutant EGFRvIII gene. *Cell Growth Differ* 6:1251-1259.
- Bellezza G, Del Sordo R, Colella R, Ludovini V, Ragusa M, Bianconi F, Ferri I, Borri F, Chiari R, Puma F, Crino L, Sidoni A (2013) Co-expression of receptors of the HER family correlates with clinical outcome in non-small cell lung cancer (NSCLC). *Virchows Arch* 463:663-671.
- Berens ME, Rief MD, Shapiro JR, Haskett D, Giese A, Joy A, Coons SW (1996) Proliferation and motility responses of primary and recurrent gliomas related to changes in epidermal growth factor receptor expression. *J Neurooncol* 27:11-22.
- Biernat W, Huang H, Yokoo H, Kleihues P, Ohgaki H (2004) Predominant expression of mutant EGFR (EGFRvIII) is rare in primary glioblastomas. *Brain Pathol* 14:131-136.
- Burger H, van Tol H, Boersma AW, Brok M, Wiemer EA, Stoter G, Nooter K (2004) Imatinib mesylate (STI571) is a substrate for the breast cancer resistance protein (BCRP)/ABCG2 drug pump. *Blood* 104:2940-2942.
- Carlomagno F, Vitagliano D, Guida T, Ciardiello F, Tortora G, Vecchio G, Ryan AJ, Fontanini G, Fusco A, Santoro M (2002) ZD6474, an orally available inhibitor of KDR tyrosine kinase activity, efficiently blocks oncogenic RET kinases. *Cancer Res* 62:7284-7290.
- Carlson BL, Pokorny JL, Schroeder MA, Sarkaria JN (2011) Establishment, maintenance and in vitro and in vivo applications of primary human glioblastoma multiforme (GBM) xenograft models for translational biology studies and drug discovery. *Curr Protoc Pharmacol Chapter 14:Unit 14 16*.
- Chen G, Gharib TG, Huang CC, Taylor JM, Misek DE, Kardia SL, Giordano TJ, Iannettoni MD, Orringer MB, Hanash SM, Beer DG (2002) Discordant protein and mRNA expression in lung adenocarcinomas. *Mol Cell Proteomics* 1:304-313.
- Chen ZS, Lee K, Kruh GD (2001) Transport of cyclic nucleotides and estradiol 17-beta-D-glucuronide by multidrug resistance protein 4. Resistance to 6-mercaptopurine and 6-thioguanine. *J Biol Chem* 276:33747-33754.

- Chen ZS, Robey RW, Belinsky MG, Shchaveleva I, Ren XQ, Sugimoto Y, Ross DD, Bates SE, Kruh GD (2003) Transport of methotrexate, methotrexate polyglutamates, and 17beta-estradiol 17-(beta-D-glucuronide) by ABCG2: effects of acquired mutations at R482 on methotrexate transport. *Cancer Res* 63:4048-4054.
- Chung JK, Lee YJ, Kim C, Choi SR, Kim M, Lee K, Jeong JM, Lee DS, Jang JJ, Lee MC (1999) Mechanisms related to [18F]fluorodeoxyglucose uptake of human colon cancers transplanted in nude mice. *J Nucl Med* 40:339-346.
- Cole PD, Kamen BA, Gorlick R, Banerjee D, Smith AK, Magill E, Bertino JR (2001) Effects of overexpression of gamma-Glutamyl hydrolase on methotrexate metabolism and resistance. *Cancer Res* 61:4599-4604.
- Coluccia D, Fandino J, Fujioka M, Cordovi S, Muroi C, Landolt H (2010) Intraoperative 5-aminolevulinic-acid-induced fluorescence in meningiomas. *Acta Neurochir (Wien)* 152:1711-1719.
- Dai H, Marbach P, Lemaire M, Hayes M, Elmquist WF (2003) Distribution of STI-571 to the brain is limited by P-glycoprotein-mediated efflux. *J Pharmacol Exp Ther* 304:1085-1092.
- Dan S, Tsunoda T, Kitahara O, Yanagawa R, Zembutsu H, Katagiri T, Yamazaki K, Nakamura Y, Yamori T (2002) An integrated database of chemosensitivity to 55 anticancer drugs and gene expression profiles of 39 human cancer cell lines. *Cancer Res* 62:1139-1147.
- Deckert J, Park PU, Chicklas S, Yi Y, Li M, Lai KC, Mayo MF, Carrigan CN, Erickson HK, Pinkas J, Lutz RJ, Chittenden T, Lambert JM (2013) A novel anti-CD37 antibody-drug conjugate with multiple anti-tumor mechanisms for the treatment of B-cell malignancies. *Blood* 122:3500-3510.
- Decleves X, Fajac A, Lehmann-Che J, Tardy M, Mercier C, Hurbain I, Laplanche JL, Bernaudin JF, Scherrmann JM (2002) Molecular and functional MDR1-Pgp and MRPs expression in human glioblastoma multiforme cell lines. *Int J Cancer* 98:173-180.
- DeVita VT, Jr., Chu E (2008) A history of cancer chemotherapy. *Cancer Res* 68:8643-8653.
- Diedrich U, Lucius J, Baron E, Behnke J, Pabst B, Zoll B (1995) Distribution of epidermal growth factor receptor gene amplification in brain tumours and correlation to prognosis. *J Neurol* 242:683-688.
- Dowsett M, Bartlett J, Ellis IO, Salter J, Hills M, Mallon E, Watters AD, Cooke T, Paish C, Wencyk PM, Pinder SE (2003) Correlation between immunohistochemistry (HercepTest) and fluorescence in situ hybridization (FISH) for HER-2 in 426 breast carcinomas from 37 centres. *J Pathol* 199:418-423.
- Fedrigo CA, Grivicich I, Schunemann DP, Chemale IM, dos Santos D, Jacovas T, Boschetti PS, Jotz GP, Braga Filho A, da Rocha AB (2011) Radioresistance of human glioma spheroids and expression of HSP70, p53 and EGFr. *Radiat Oncol* 6:156.
- Froberg MK, Gerhart DZ, Enerson BE, Manivel C, Guzman-Paz M, Seacotte N, Drewes LR (2001) Expression of monocarboxylate transporter MCT1 in normal and neoplastic human CNS tissues. *Neuroreport* 12:761-765.
- Gan HK, Cvrljevic AN, Johns TG (2013) The epidermal growth factor receptor variant III (EGFRvIII): where wild things are altered. *FEBS J* 280:5350-5370.
- Gan HK, Kaye AH, Luwor RB (2009) The EGFRvIII variant in glioblastoma

- multiforme. *J Clin Neurosci* 16:748-754.
- Ganapathy V, Thangaraju M, Prasad PD (2009) Nutrient transporters in cancer: relevance to Warburg hypothesis and beyond. *Pharmacol Ther* 121:29-40.
- Garrido W, Munoz M, San Martin R, Quezada C (2011) FK506 confers chemosensitivity to anticancer drugs in glioblastoma multiforme cells by decreasing the expression of the multiple resistance-associated protein-1. *Biochem Biophys Res Commun* 411:62-68.
- Goetsch L, Haeuw JF, Beau-Larvor C, Gonzalez A, Zanna L, Malissard M, Lepecquet AM, Robert A, Bailly C, Broussas M, Corvaia N (2013) A novel role for junctional adhesion molecule-A in tumor proliferation: modulation by an anti-JAM-A monoclonal antibody. *Int J Cancer* 132:1463-1474.
- Gorlick R, Goker E, Trippett T, Waltham M, Banerjee D, Bertino JR (1996) Intrinsic and acquired resistance to methotrexate in acute leukemia. *N Engl J Med* 335:1041-1048.
- Grillon E, Farion R, Fablet K, De Waard M, Tse CM, Donowitz M, Remy C, Coles JA (2011) The spatial organization of proton and lactate transport in a rat brain tumor. *PLoS One* 6:e17416.
- Grossmann AH, Samowitz WS (2011) Epidermal growth factor receptor pathway mutations and colorectal cancer therapy. *Arch Pathol Lab Med* 135:1278-1282.
- Guha A, Dashner K, Black PM, Wagner JA, Stiles CD (1995) Expression of PDGF and PDGF receptors in human astrocytoma operation specimens supports the existence of an autocrine loop. *Int J Cancer* 60:168-173.
- Haberler C, Gelpi E, Marosi C, Rossler K, Birner P, Budka H, Hainfellner JA (2006) Immunohistochemical analysis of platelet-derived growth factor receptor- α , - β , c-kit, c-abl, and arg proteins in glioblastoma: possible implications for patient selection for imatinib mesylate therapy. *J Neurooncol* 76:105-109.
- Harris RC, Chung E, Coffey RJ (2003) EGF receptor ligands. *Exp Cell Res* 284:2-13.
- Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, de Tribolet N, Weller M, Kros JM, Hainfellner JA, Mason W, Mariani L, Bromberg JE, Hau P, Mirimanoff RO, Cairncross JG, Janzer RC, Stupp R (2005) MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med* 352:997-1003.
- Hermanson M, Funa K, Hartman M, Claesson-Welsh L, Heldin CH, Westermarck B, Nister M (1992) Platelet-derived growth factor and its receptors in human glioma tissue: expression of messenger RNA and protein suggests the presence of autocrine and paracrine loops. *Cancer Res* 52:3213-3219.
- Hu S, Chen Z, Franke R, Orwick S, Zhao M, Rudek MA, Sparreboom A, Baker SD (2009) Interaction of the multikinase inhibitors sorafenib and sunitinib with solute carriers and ATP-binding cassette transporters. *Clin Cancer Res* 15:6062-6069.
- Huang Y, Sadee W (2006) Membrane transporters and channels in chemoresistance and -sensitivity of tumor cells. *Cancer Lett* 239:168-182.
- Imami K, Sugiyama N, Imamura H, Wakabayashi M, Tomita M, Taniguchi M, Ueno T, Toi M, Ishihama Y (2012) Temporal profiling of lapatinib-suppressed phosphorylation signals in EGFR/HER2 pathways. *Mol Cell Proteomics* 11:1741-1757.
- Ioannou N, Dalgleish AG, Seddon AM, Mackintosh D, Guertler U, Solca F, Modjtahedi H (2011) Anti-tumour activity of afatinib, an irreversible ErbB family blocker, in human pancreatic tumour cells. *Br J Cancer* 105:1554-1562.

- Jain RK, di Tomaso E, Duda DG, Loeffler JS, Sorensen AG, Batchelor TT (2007) Angiogenesis in brain tumours. *Nat Rev Neurosci* 8:610-622.
- Jaros E, Perry RH, Adam L, Kelly PJ, Crawford PJ, Kalbag RM, Mendelow AD, Sengupta RP, Pearson AD (1992) Prognostic implications of p53 protein, epidermal growth factor receptor, and Ki-67 labelling in brain tumours. *Br J Cancer* 66:373-385.
- Joensuu H, Pupa M, Sihto H, Tynnen O, Nupponen NN (2005) Amplification of genes encoding KIT, PDGFRalpha and VEGFR2 receptor tyrosine kinases is frequent in glioblastoma multiforme. *J Pathol* 207:224-231.
- Kamal A, Thao L, Sensintaffar J, Zhang L, Boehm MF, Fritz LC, Burrows FJ (2003) A high-affinity conformation of Hsp90 confers tumour selectivity on Hsp90 inhibitors. *Nature* 425:407-410.
- Kameyama R, Yamamoto Y, Izuishi K, Sano T, Nishiyama Y (2011) Correlation of 18F-FLT uptake with equilibrative nucleoside transporter-1 and thymidine kinase-1 expressions in gastrointestinal cancer. *Nucl Med Commun* 32:460-465.
- Kamiie J, Ohtsuki S, Iwase R, Ohmine K, Katsukura Y, Yanai K, Sekine Y, Uchida Y, Ito S, Terasaki T (2008) Quantitative atlas of membrane transporter proteins: development and application of a highly sensitive simultaneous LC/MS/MS method combined with novel in-silico peptide selection criteria. *Pharm Res* 25:1469-1483.
- Kawabata S, Oka M, Shiozawa K, Tsukamoto K, Nakatomi K, Soda H, Fukuda M, Ikegami Y, Sugahara K, Yamada Y, Kamihira S, Doyle LA, Ross DD, Kohno S (2001) Breast cancer resistance protein directly confers SN-38 resistance of lung cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 280:1216-1223.
- Kawamura T, Kusakabe T, Sugino T, Watanabe K, Fukuda T, Nashimoto A, Honma K, Suzuki T (2001) Expression of glucose transporter-1 in human gastric carcinoma: association with tumor aggressiveness, metastasis, and patient survival. *Cancer* 92:634-641.
- Kleihues P, Ohgaki H (1999) Primary and secondary glioblastomas: from concept to clinical diagnosis. *Neuro Oncol* 1:44-51.
- Kobayashi H, Takemura Y, Ohnuma T (1998) Variable expression of RFC1 in human leukemia cell lines resistant to antifolates. *Cancer Lett* 124:135-142.
- Koka V, Potti A, Forseen SE, Pervez H, Fraiman GN, Koch M, Levitt R (2003) Role of Her-2/neu overexpression and clinical determinants of early mortality in glioblastoma multiforme. *Am J Clin Oncol* 26:332-335.
- Krist DA, Yarden Y (1996) Differences between phosphotyrosine accumulation and Neu/ErbB-2 receptor expression in astrocytic proliferative processes. Implications for glial oncogenesis. *Cancer* 78:1272-1283.
- Lacroix M, Abi-Said D, Fournier DR, Gokaslan ZL, Shi W, DeMonte F, Lang FF, McCutcheon IE, Hassenbusch SJ, Holland E, Hess K, Michael C, Miller D, Sawaya R (2001) A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival. *J Neurosurg* 95:190-198.
- Lagas JS, van Waterschoot RA, Sparidans RW, Wagenaar E, Beijnen JH, Schinkel AH (2010) Breast cancer resistance protein and P-glycoprotein limit sorafenib brain accumulation. *Mol Cancer Ther* 9:319-326.
- Lage H (2003) Molecular analysis of therapy resistance in gastric cancer. *Dig Dis* 21:326-338.

- Leier I, Jedlitschky G, Buchholz U, Center M, Cole SP, Deeley RG, Keppler D (1996) ATP-dependent glutathione disulphide transport mediated by the MRP gene-encoded conjugate export pump. *Biochem J* 314 (Pt 2):433-437.
- Lemos C, Kathmann I, Giovannetti E, Calhau C, Jansen G, Peters GJ (2009) Impact of cellular folate status and epidermal growth factor receptor expression on BCRP/ABCG2-mediated resistance to gefitinib and erlotinib. *Br J Cancer* 100:1120-1127.
- Levitzki A, Klein S (2010) Signal transduction therapy of cancer. *Mol Aspects Med* 31:287-329.
- Lewis WS, Cody V, Galitsky N, Luft JR, Pangborn W, Chunduru SK, Spencer HT, Appleman JR, Blakley RL (1995) Methotrexate-resistant variants of human dihydrofolate reductase with substitutions of leucine 22. Kinetics, crystallography, and potential as selectable markers. *J Biol Chem* 270:5057-5064.
- Li J, Cusatis G, Brahmer J, Sparreboom A, Robey RW, Bates SE, Hidalgo M, Baker SD (2007) Association of variant ABCG2 and the pharmacokinetics of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in cancer patients. *Cancer Biol Ther* 6:432-438.
- Li YC, Fung KP, Kwok TT, Lee CY, Suen YK, Kong SK (2004) Mitochondria-targeting drug oligomycin blocked P-glycoprotein activity and triggered apoptosis in doxorubicin-resistant HepG2 cells. *Chemotherapy* 50:55-62.
- Liu FS (2009) Mechanisms of chemotherapeutic drug resistance in cancer therapy--a quick review. *Taiwan J Obstet Gynecol* 48:239-244.
- Long DM (1970) Capillary ultrastructure and the blood-brain barrier in human malignant brain tumors. *J Neurosurg* 32:127-144.
- Loscher W, Potschka H (2005) Blood-brain barrier active efflux transporters: ATP-binding cassette gene family. *NeuroRx* 2:86-98.
- Lotfi K, Karlsson K, Fyrberg A, Juliusson G, Jonsson V, Peterson C, Eriksson S, Albertioni F (2006) The pattern of deoxycytidine- and deoxyguanosine kinase activity in relation to messenger RNA expression in blood cells from untreated patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Biochem Pharmacol* 71:882-890.
- Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P (2007) The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* 114:97-109.
- Lu C, Shervington A (2008) Chemoresistance in gliomas. *Mol Cell Biochem* 312:71-80.
- Lu X, Gong S, Monks A, Zaharevitz D, Moscow JA (2002) Correlation of nucleoside and nucleobase transporter gene expression with antimetabolite drug cytotoxicity. *J Exp Ther Oncol* 2:200-212.
- Maliepaard M, van Gastelen MA, de Jong LA, Pluim D, van Waardenburg RC, Ruevekamp-Helmers MC, Floot BG, Schellens JH (1999) Overexpression of the BCRP/MXR/ABCP gene in a topotecan-selected ovarian tumor cell line. *Cancer Res* 59:4559-4563.
- Marce S, Molina-Arcas M, Villamor N, Casado FJ, Campo E, Pastor-Anglada M, Colomer D (2006) Expression of human equilibrative nucleoside transporter 1 (hENT1) and its correlation with gemcitabine uptake and cytotoxicity in mantle cell lymphoma. *Haematologica* 91:895-902.
- McSherry EA, McGee SF, Jirstrom K, Doyle EM, Brennan DJ, Landberg G, Dervan PA,

- Hopkins AM, Gallagher WM (2009) JAM-A expression positively correlates with poor prognosis in breast cancer patients. *Int J Cancer* 125:1343-1351.
- Mellinghoff IK, Wang MY, Vivanco I, Haas-Kogan DA, Zhu S, Dia EQ, Lu KV, Yoshimoto K, Huang JH, Chute DJ, Riggs BL, Horvath S, Liao LM, Cavenee WK, Rao PN, Beroukhi R, Peck TC, Lee JC, Sellers WR, Stokoe D, Prados M, Cloughesy TF, Sawyers CL, Mischel PS (2005) Molecular determinants of the response of glioblastomas to EGFR kinase inhibitors. *N Engl J Med* 353:2012-2024.
- Mendiburu-Elicabe M, Yin D, Hadaczek P, Zhai Y, Forsayeth J, Bankiewicz KS (2012) Systemic rapamycin alone may not be a treatment option for malignant glioma: evidence from an in vivo study. *J Neurooncol* 108:53-58.
- Mineo JF, Bordron A, Baroncini M, Maura CA, Ramirez C, Siminski RM, Berthou C, Dam Hieu P (2007) Low HER2-expressing glioblastomas are more often secondary to anaplastic transformation of low-grade glioma. *J Neurooncol* 85:281-287.
- Mineo JF, Bordron A, Quintin-Roue I, Loisel S, Ster KL, Buhe V, Lagarde N, Berthou C (2004) Recombinant humanised anti-HER2/neu antibody (Herceptin) induces cellular death of glioblastomas. *Br J Cancer* 91:1195-1199.
- Miyamoto M, Yoshida Y, Taguchi I, Nagasaka Y, Tasaki M, Zhang Y, Xu B, Nameta M, Sezaki H, Cuellar LM, Osawa T, Morishita H, Sekiyama S, Yaoita E, Kimura K, Yamamoto T (2007) In-depth proteomic profiling of the normal human kidney glomerulus using two-dimensional protein prefractionation in combination with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Proteome Res* 6:3680-3690.
- Miyatake S, Kajimoto Y, Kuroiwa T (2009) [Intraoperative photo-dynamic diagnosis of brain tumors]. *Brain Nerve* 61:835-842.
- Mladkova N, Chakravarti A (2009) Molecular profiling in glioblastoma: prelude to personalized treatment. *Curr Oncol Rep* 11:53-61.
- Molina-Arcas M, Marce S, Villamor N, Huber-Ruano I, Casado FJ, Bellosillo B, Montserrat E, Gil J, Colomer D, Pastor-Anglada M (2005) Equilibrative nucleoside transporter-2 (hENT2) protein expression correlates with ex vivo sensitivity to fludarabine in chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells. *Leukemia* 19:64-68.
- Morandell S, Stasyk T, Skvortsov S, Ascher S, Huber LA (2008) Quantitative proteomics and phosphoproteomics reveal novel insights into complexity and dynamics of the EGFR signaling network. *Proteomics* 8:4383-4401.
- Morant R (2001) Neoadjuvant and adjuvant chemotherapy of locally advanced stomach cancer. *Onkologie* 24:116-121.
- Moscow JA, Connolly T, Myers TG, Cheng CC, Paull K, Cowan KH (1997) Reduced folate carrier gene (RFC1) expression and anti-folate resistance in transfected and non-selected cell lines. *Int J Cancer* 72:184-190.
- Naik MU, Naik TU, Suckow AT, Duncan MK, Naik UP (2008) Attenuation of junctional adhesion molecule-A is a contributing factor for breast cancer cell invasion. *Cancer Res* 68:2194-2203.
- Nakatsu N, Yoshida Y, Yamazaki K, Nakamura T, Dan S, Fukui Y, Yamori T (2005) Chemosensitivity profile of cancer cell lines and identification of genes determining chemosensitivity by an integrated bioinformatical approach using cDNA arrays. *Mol Cancer Ther* 4:399-412.
- Nguyen KS, Kobayashi S, Costa DB (2009) Acquired resistance to epidermal growth

- factor receptor tyrosine kinase inhibitors in non-small-cell lung cancers dependent on the epidermal growth factor receptor pathway. *Clin Lung Cancer* 10:281-289.
- Nicholas MK, Lukas RV, Jafri NF, Faoro L, Salgia R (2006) Epidermal growth factor receptor - mediated signal transduction in the development and therapy of gliomas. *Clin Cancer Res* 12:7261-7270.
- Nishikawa R, Ji XD, Harmon RC, Lazar CS, Gill GN, Caveness WK, Huang HJ (1994) A mutant epidermal growth factor receptor common in human glioma confers enhanced tumorigenicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:7727-7731.
- Nishioka T, Oda Y, Seino Y, Yamamoto T, Inagaki N, Yano H, Imura H, Shigemoto R, Kikuchi H (1992) Distribution of the glucose transporters in human brain tumors. *Cancer Res* 52:3972-3979.
- Nunoya K, Grant CE, Zhang D, Cole SP, Deeley RG (2003) Molecular cloning and pharmacological characterization of rat multidrug resistance protein 1 (mrp1). *Drug Metab Dispos* 31:1016-1026.
- Ocheltree SM, Shen H, Hu Y, Xiang J, Keep RF, Smith DE (2004) Role of PEPT2 in the choroid plexus uptake of glycylsarcosine and 5-aminolevulinic acid: studies in wild-type and null mice. *Pharm Res* 21:1680-1685.
- Ohtsuki S, Schaefer O, Kawakami H, Inoue T, Liehner S, Saito A, Ishiguro N, Kishimoto W, Ludwig-Schwellinger E, Ebner T, Terasaki T (2012) Simultaneous absolute protein quantification of transporters, cytochromes P450, and UDP-glucuronosyltransferases as a novel approach for the characterization of individual human liver: comparison with mRNA levels and activities. *Drug Metab Dispos* 40:83-92.
- Ohtsuki S, Uchida Y, Kubo Y, Terasaki T (2011) Quantitative targeted absolute proteomics-based ADME research as a new path to drug discovery and development: methodology, advantages, strategy, and prospects. *J Pharm Sci* 100:3547-3559.
- Olsen JV, Blagoev B, Gnäd F, Macek B, Kumar C, Mortensen P, Mann M (2006) Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. *Cell* 127:635-648.
- Oshima G, Wennerberg J, Yamatodani T, Kjellen E, Mineta H, Johnsson A, Ekblad L (2012) Autocrine epidermal growth factor receptor ligand production and cetuximab response in head and neck squamous cell carcinoma cell lines. *J Cancer Res Clin Oncol* 138:491-499.
- Paez JG, Janne PA, Lee JC, Tracy S, Greulich H, Gabriel S, Herman P, Kaye FJ, Lindeman N, Boggon TJ, Naoki K, Sasaki H, Fujii Y, Eck MJ, Sellers WR, Johnson BE, Meyerson M (2004) EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* 304:1497-1500.
- Peignan L, Garrido W, Segura R, Melo R, Rojas D, Carcamo JG, San Martin R, Quezada C (2011) Combined use of anticancer drugs and an inhibitor of multiple drug resistance-associated protein-1 increases sensitivity and decreases survival of glioblastoma multiforme cells in vitro. *Neurochem Res* 36:1397-1406.
- Phay JE, Shah MH (2010) Targeting RET receptor tyrosine kinase activation in cancer. *Clin Cancer Res* 16:5936-5941.
- Pinheiro C, Reis RM, Ricardo S, Longatto-Filho A, Schmitt F, Baltazar F (2010) Expression of monocarboxylate transporters 1, 2, and 4 in human tumours and

- their association with CD147 and CD44. *J Biomed Biotechnol* 2010:427694.
- Puputti M, Tynneninen O, Sihto H, Blom T, Maenpää H, Isola J, Paetau A, Joensuu H, Nupponen NN (2006) Amplification of KIT, PDGFRA, VEGFR2, and EGFR in gliomas. *Mol Cancer Res* 4:927-934.
- Raizer JJ (2005) HER1/EGFR tyrosine kinase inhibitors for the treatment of glioblastoma multiforme. *J Neurooncol* 74:77-86.
- Ranza E, Facchetti A, Morbini P, Benericetti E, Nano R (2007) Exogenous platelet-derived growth factor (PDGF) induces human astrocytoma cell line proliferation. *Anticancer Res* 27:2161-2166.
- Riedl CC, Akhurst T, Larson S, Stanziale SF, Tuorto S, Bhargava A, Hricak H, Klimstra D, Fong Y (2007) 18F-FDG PET scanning correlates with tissue markers of poor prognosis and predicts mortality for patients after liver resection for colorectal metastases. *J Nucl Med* 48:771-775.
- Rivenbark AG, O'Connor SM, Coleman WB (2013) Molecular and cellular heterogeneity in breast cancer: challenges for personalized medicine. *Am J Pathol* 183:1113-1124.
- Ronellenfitsch MW, Steinbach JP, Wick W (2010) Epidermal growth factor receptor and mammalian target of rapamycin as therapeutic targets in malignant glioma: current clinical status and perspectives. *Target Oncol* 5:183-191.
- Rosenzweig SA (2012) Acquired resistance to drugs targeting receptor tyrosine kinases. *Biochem Pharmacol* 83:1041-1048.
- Saijo N, Takeuchi M, Kunitoh H (2009) Reasons for response differences seen in the V15-32, INTEREST and IPASS trials. *Nat Rev Clin Oncol* 6:287-294.
- Santoro M, Melillo RM, Carlomagno F, Vecchio G, Fusco A (2004) Minireview: RET: normal and abnormal functions. *Endocrinology* 145:5448-5451.
- Sarkaria JN, Yang L, Grogan PT, Kitange GJ, Carlson BL, Schroeder MA, Galanis E, Giannini C, Wu W, Dinca EB, James CD (2007) Identification of molecular characteristics correlated with glioblastoma sensitivity to EGFR kinase inhibition through use of an intracranial xenograft test panel. *Mol Cancer Ther* 6:1167-1174.
- Sartore-Bianchi A, Bencardino K, Cassingena A, Venturini F, Funaioli C, Cipani T, Amatu A, Pietrogiovanna L, Schiavo R, Di Nicolantonio F, Artale S, Bardelli A, Siena S (2010) Therapeutic implications of resistance to molecular therapies in metastatic colorectal cancer. *Cancer Treat Rev* 36 Suppl 3:S1-5.
- Scaltriti M, Baselga J (2006) The epidermal growth factor receptor pathway: a model for targeted therapy. *Clin Cancer Res* 12:5268-5272.
- Schadendorf D, Worm M, Algermissen B, Kohlbus CM, Czarnetzki BM (1994) Chemosensitivity testing of human malignant melanoma. A retrospective analysis of clinical response and in vitro drug sensitivity. *Cancer* 73:103-108.
- Sharif KA, Moscow JA, Goldman ID (1998) Concentrating capacity of the human reduced folate carrier (hRFC1) in human ZR-75 breast cancer cell lines. *Biochem Pharmacol* 55:1683-1689.
- Sharma SV, Bell DW, Settleman J, Haber DA (2007) Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nat Rev Cancer* 7:169-181.
- Shien K, Ueno T, Tsukuda K, Soh J, Suda K, Kubo T, Furukawa M, Muraoka T, Maki Y, Tanaka N, Yamamoto H, Kiura K, Mitsudomi T, Toyooka S, Miyoshi S (2012) Knockdown of the epidermal growth factor receptor gene to investigate its therapeutic potential for the treatment of non-small-cell lung cancers. *Clin Lung*

- Cancer 13:488-493.
- Shinojima N, Tada K, Shiraishi S, Kamiryo T, Kochi M, Nakamura H, Makino K, Saya H, Hirano H, Kuratsu J, Oka K, Ishimaru Y, Ushio Y (2003) Prognostic value of epidermal growth factor receptor in patients with glioblastoma multiforme. *Cancer Res* 63:6962-6970.
- Sidoryk M, Matyja E, Dybel A, Zielinska M, Bogucki J, Jaskolski DJ, Liberski PP, Kowalczyk P, Albrecht J (2004) Increased expression of a glutamine transporter SNAT3 is a marker of malignant gliomas. *Neuroreport* 15:575-578.
- Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, Fleming T, Eiermann W, Wolter J, Pegram M, Baselga J, Norton L (2001) Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 344:783-792.
- Stark AM, Witzel P, Strege RJ, Hugo HH, Mehdorn HM (2003) p53, mdm2, EGFR, and msh2 expression in paired initial and recurrent glioblastoma multiforme. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 74:779-783.
- Steiner HH, Karcher S, Mueller MM, Nalbantis E, Kunze S, Herold-Mende C (2004) Autocrine pathways of the vascular endothelial growth factor (VEGF) in glioblastoma multiforme: clinical relevance of radiation-induced increase of VEGF levels. *J Neurooncol* 66:129-138.
- Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, Ludwin SK, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Cairncross JG, Eisenhauer E, Mirimanoff RO (2005) Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 352:987-996.
- Sulkes A (2010) Novel multitargeted anticancer oral therapies: sunitinib and sorafenib as a paradigm. *Isr Med Assoc J* 12:628-632.
- Szakacs G, Paterson JK, Ludwig JA, Booth-Genthe C, Gottesman MM (2006) Targeting multidrug resistance in cancer. *Nat Rev Drug Discov* 5:219-234.
- Tang SC, Lagas JS, Lankheet NA, Poller B, Hillebrand MJ, Rosing H, Beijnen JH, Schinkel AH (2012) Brain accumulation of sunitinib is restricted by P-glycoprotein (ABCB1) and breast cancer resistance protein (ABCG2) and can be enhanced by oral elacridar and sunitinib coadministration. *Int J Cancer* 130:223-233.
- Trog D, Moenkemann H, Haertel N, Schuller H, Golubnitschaja O (2005) Expression of ABC-1 transporter is elevated in human glioma cells under irradiation and temozolomide treatment. *Amino Acids* 28:213-219.
- Turner N, Grose R (2010) Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer. *Nat Rev Cancer* 10:116-129.
- Uchida Y, Kamiie J, Ohtsuki S, Terasaki T (2007) Multichannel liquid chromatography-tandem mass spectrometry cocktail method for comprehensive substrate characterization of multidrug resistance-associated protein 4 transporter. *Pharm Res* 24:2281-2296.
- Uchida Y, Ohtsuki S, Katsukura Y, Ikeda C, Suzuki T, Kamiie J, Terasaki T (2011) Quantitative targeted absolute proteomics of human blood-brain barrier transporters and receptors. *J Neurochem* 117:333-345.
- Uchida Y, Tachikawa M, Obuchi W, Hoshi Y, Tomioka Y, Ohtsuki S, Terasaki T (2013) A study protocol for quantitative targeted absolute proteomics (QTAP) by LC-MS/MS: application for inter-strain differences in protein expression levels

- of transporters, receptors, claudin-5, and marker proteins at the blood-brain barrier in ddY, FVB, and C57BL/6J mice. *Fluids Barriers CNS* 10:21.
- Uhrbom L, Hesselager G, Nister M, Westermarck B (1998) Induction of brain tumors in mice using a recombinant platelet-derived growth factor B-chain retrovirus. *Cancer Res* 58:5275-5279.
- Ullah MS, Davies AJ, Halestrap AP (2006) The plasma membrane lactate transporter MCT4, but not MCT1, is up-regulated by hypoxia through a HIF-1alpha-dependent mechanism. *J Biol Chem* 281:9030-9037.
- Uribe P, Gonzalez S (2011) Epidermal growth factor receptor (EGFR) and squamous cell carcinoma of the skin: molecular bases for EGFR-targeted therapy. *Pathol Res Pract* 207:337-342.
- Utsumi T (2010) [Comprehensive analysis of lipid modifications of proteins using cell-free protein synthesis system]. *Seikagaku* 82:799-813.
- Utsunomiya-Tate N, Endou H, Kanai Y (1996) Cloning and functional characterization of a system ASC-like Na⁺-dependent neutral amino acid transporter. *J Biol Chem* 271:14883-14890.
- van Aubel RA, Smeets PH, Peters JG, Bindels RJ, Russel FG (2002) The MRP4/ABCC4 gene encodes a novel apical organic anion transporter in human kidney proximal tubules: putative efflux pump for urinary cAMP and cGMP. *J Am Soc Nephrol* 13:595-603.
- Varela M, Ranuncolo SM, Morand A, Lastiri J, De Kier Joffe EB, Puricelli LI, Pallotta MG (2004) EGF-R and PDGF-R, but not bcl-2, overexpression predict overall survival in patients with low-grade astrocytomas. *J Surg Oncol* 86:34-40.
- Verhaak RG, Hoadley KA, Purdom E, Wang V, Qi Y, Wilkerson MD, Miller CR, Ding L, Golub T, Mesirov JP, Alexe G, Lawrence M, O'Kelly M, Tamayo P, Weir BA, Gabriel S, Winckler W, Gupta S, Jakkula L, Feiler HS, Hodgson JG, James CD, Sarkaria JN, Brennan C, Kahn A, Spellman PT, Wilson RK, Speed TP, Gray JW, Meyerson M, Getz G, Perou CM, Hayes DN (2010) Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell* 17:98-110.
- Volk EL, Schneider E (2003) Wild-type breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) is a methotrexate polyglutamate transporter. *Cancer Res* 63:5538-5543.
- Waltham MC, Li WW, Gritsman H, Tong WP, Bertino JR (1997) gamma-Glutamyl hydrolase from human sarcoma HT-1080 cells: characterization and inhibition by glutamine antagonists. *Mol Pharmacol* 51:825-832.
- Whitesell L, Lindquist SL (2005) HSP90 and the chaperoning of cancer. *Nat Rev Cancer* 5:761-772.
- Yamori T (2003) Panel of human cancer cell lines provides valuable database for drug discovery and bioinformatics. *Cancer Chemother Pharmacol* 52 Suppl 1:S74-79.
- Yamori T, Matsunaga A, Sato S, Yamazaki K, Komi A, Ishizu K, Mita I, Edatsugi H, Matsuba Y, Takezawa K, Nakanishi O, Kohno H, Nakajima Y, Komatsu H, Andoh T, Tsuruo T (1999) Potent antitumor activity of MS-247, a novel DNA minor groove binder, evaluated by an in vitro and in vivo human cancer cell line panel. *Cancer Res* 59:4042-4049.
- Yang L, Clarke MJ, Carlson BL, Mladek AC, Schroeder MA, Decker P, Wu W, Kitange GJ, Grogan PT, Goble JM, Uhm J, Galanis E, Giannini C, Lane HA, James CD, Sarkaria JN (2008) PTEN loss does not predict for response to RAD001

- (Everolimus) in a glioblastoma orthotopic xenograft test panel. Clin Cancer Res 14:3993-4001.
- Yoshikawa A, Nakada M, Ohtsuki S, Hayashi Y, Obuchi W, Sato Y, Ikeda C, Watanabe T, Kawahara Y, Hasegawa T, Sabit H, Kita D, Nakanuma Y, Terasaki T, Hamada JI (2012) Recurrent anaplastic meningioma treated by sunitinib based on results from quantitative proteomics. Neuropathol Appl Neurobiol 38:105-110.
- Zeng H, Chen ZS, Belinsky MG, Rea PA, Kruh GD (2001) Transport of methotrexate (MTX) and folates by multidrug resistance protein (MRP) 3 and MRP1: effect of polyglutamylation on MTX transport. Cancer Res 61:7225-7232.
- Zhang G, Fang B, Liu RZ, Lin H, Kinose F, Bai Y, Oguz U, Remily-Wood ER, Li J, Altioek S, Eschrich S, Koomen J, Haura EB (2011) Mass spectrometry mapping of epidermal growth factor receptor phosphorylation related to oncogenic mutations and tyrosine kinase inhibitor sensitivity. J Proteome Res 10:305-319.

発表論文リスト

本学位論文は以下の原著論文を基礎としたものである。

Wataru Obuchi, Sumio Ohtsuki, Yasuo Uchida, Ken Ohmine, Takao Yamori, Tetsuya Terasaki.

Identification of transporters associated with Etoposide sensitivity of stomach cancer cell lines and methotrexate sensitivity of breast cancer cell lines by quantitative targeted absolute proteomics.

Molecular Pharmacology, 2013, 83(2): 490-500.

謝辞

本研究において、終始御指導と御鞭撻を賜りました東北大学大学院薬学研究科 薬物送達学分野 教授 寺崎哲也 先生に謹んで感謝致します。

本論文の審査にあたり、有益な御助言を賜りました東北大学大学院薬学研究科 がん化学療法薬学分野 教授 富岡佳久 先生、並びに同臨床分析化学分野 教授 大江知行 先生に厚く御礼申し上げます。

本研究全般にわたり終始丁寧な御指導と御助言を賜りました熊本大学大学院生命科学研究部 微生物薬学分野 教授 大槻純男 先生 (旧: 東北大学大学院薬学研究科 薬物送達学分野 准教授) に心より感謝致します。

本研究を進めるにあたり有益な御指導と御助言を賜りました東北大学大学院薬学研究科 薬物送達学分野 准教授 立川正憲 先生、並びに同助教 内田康雄 先生に心より感謝致します。

本研究に際して癌細胞パネルに含まれる細胞株を快く恵与下さり、有益な御助言を賜りました公益財団法人がん研究会がん化学療法センター 分子薬理部 矢守隆夫 氏に謹んで感謝致します。

本研究に際してヒト悪性腫瘍組織検体を快く恵与下さり、有益な御助言を賜りました金沢大学大学院医学系研究科 脳・脊髄機能制御学 教授 濱田潤一郎 先生、並びに同講師 中田光俊 先生に謹んで感謝致します。

本研究に際して悪性脳腫瘍 xenograft 検体を快く恵与下さり、有益な御助言を賜りました米国 Mayo Clinic, Jann N. Sarkaria 氏に謹んで感謝致します。

本研究を遂行するにあたり貴重な御指導と御助言を賜りました東北大学大学院薬学研究科 薬物送達学分野 分野研究員 渡部通寿 氏に心より感謝申し上げます。

本研究を遂行するにあたり活発に議論して下さい多くの貴重な御助言を賜りました川上裕貴 氏 (旧: 東北大学大学院薬学研究科 薬物送達学分野 分野研究員)、勝倉由樹 先生 (旧: 東北大学大学院医学系研究科 NM-GCOE 助教)、富山大学大学院医学薬学研究部 薬剤学研究室 准教授 久保義行 先生 (旧: 東北大学大学院医学系研究科 NM-GCOE 助教)、熊本大学大学院生命科学研究部 微生物薬学分野 助教 伊藤慎吾 先生 (旧: 東北大学大学院薬学研究科 薬物送達学分野 助教)、東北大学大学院薬学研究科 薬物送達学分野 卒業生 伊藤克彰 博士、同卒業生 大峰健 博士、同卒業生 岩瀬怜 氏、同卒業生 池田千絵美 氏、同卒業生 落合祐介 氏に心より感謝申し上げます。

本研究の遂行に際して多大なる御協力と御配慮を頂きました東北大学大学院薬学研究科 薬物送達学分野 金子洋介 氏、米山敏広 氏、星裕太郎 氏に心より感謝致します。

本研究全般にわたり多大なる御協力とご配慮を頂きました新富亜希子 氏、飯田尚子 氏をはじめとする東北大学大学院薬学研究科 薬物送達学分野の皆様方、並びに卒業生の方々に厚く御礼申し上げます。

最後に、長年にわたり多大なる援助と激励を下さいました家族に心より感謝致します。

平成 26 年 3 月

小渕 航